

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PAULO ROBERTO DE OLIVEIRA

“CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DE ELETRODOS MODIFICADOS COM
HEXACIANO FERRATO DE PRATA PARA A DETERMINAÇÃO
AMPEROMÉTRICA DE ISONIAZIDA”

CURITIBA

2012

PAULO ROBERTO DE OLIVEIRA

"CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DE ELETRODOS MODIFICADOS COM
HEXACIANO FERRATO DE PRATA PARA A DETERMINAÇÃO AMPEROMÉTRICA
DE ISONIAZIDA"

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Química Analítica,
Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de
Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Márcio F. Bergamini

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz H. Marcolino Jr

CURITIBA

2012

TERMO DE APROVAÇÃO

Ao meu pai e minha mãe, José e Marina,
Aos meus irmãos João, Junior e Pedro,
E à Alyne,
Agradeço.

AGRADECIMENTOS

Para a realização deste trabalho gostaria de agradecer a várias pessoas, onde sem elas não seria possível o seu desenvolvimento.

Primeiramente aos meus professores, Márcio F. Bergamini e Luiz Humberto por toda a orientação durante o desenvolvimento desse trabalho, pela dedicação, apoio e por todo conhecimento que eu adquiri nesse período. Mas principalmente, gostaria de agradecer pela paciência e atenção que tiveram comigo, e pelo companheirismo e amizade.

Ao professor Aldo Zarbin e à professora Marcela Oliveira por toda infraestrutura oferecida e disponibilidade no desenvolvimento da síntese das nanopartículas.

Aos professores Marco Grassi e Gilberto Abate pelas grandes contribuições no exame de qualificação. À professora Maria Valnice Zanoni e novamente ao professor Marco Grassi, membros desta banca.

À professora Noemi Nagata pela doação do fármaco utilizado neste trabalho.

A todos os alunos e amigos do LabQam, Tecnotrater, GQM , e demais laboratórios. Em especial à Mônica, Marcela, Rogério, César, Sandra, Belisa, Caio, Hiany, Sérgio (Foz), Carolina, Rodrigo, Eduardo (Mascote), Samantha, Edson, Adir, Chico, Patrícia, entre outros, por toda a convivência e ajuda durante a parte experimental, principalmente ao Rodrigo e Mascote pela grande disponibilidade de tempo a atenção.

A todos os membros do LabSense: Fábio, Ava, Amábile, Fran, Lis, Eduardo, Viviane, Bárbara, Talita, Felipe, Sérgio, Arthur e Maurício pela ajuda, companheirismo e principalmente por proporcionarem um bom ambiente de trabalho e ajuda no que precisei durante esse tempo.

Aos meus amigos da pensão da Dona Luzia, Ângelo, Marcelo, Leandro, Gilberto, Patrick e Felipe, pelas noites de insônia, churrascos e amizade.

A todos meus amigos de Ponta Grossa, em especial à Michelle, Cleverson, Bruno, Graciela, Gabrielle e Elieser, pela grande amizade e momentos muito especiais.

Aos meus mais que amigos, irmãos de coração, André, Rogério, Renan e Lu, pelos anos de república, pré e pós república. Pelos momentos de dificuldade e felicidade, e pelo aprendizado que tive com eles.

A CAPES pela bolsa concedida.

Em especial à Alyne que sempre me apoiou e me ajudou em tudo. Por ser não só o amor da minha vida, mas também minha melhor amiga, companheira, namorada e por proporcionar os melhores momentos de minha vida. Por estar sempre ao meu lado mesmo nos momentos mais difíceis. “Obrigado por tudo meu amor”.

E por fim, quero agradecer a toda minha família, em especial a minha mãe e meu pai, onde sem eles não seria a pessoa que sou hoje e provavelmente não estaria aqui. Por todos os ensinamentos e educação que me proporcionaram, e o amor integral que me deram. Agradeço também aos meus irmãos João, Juninho e Pedro, por serem as pessoas mais especiais da minha vida juntamente com meus pais, por todos os anos que passamos juntos, seja felizes ou tristes, por todo apoio e respeito, por serem meus melhores amigos e estarem sempre ao meu lado.

RESUMO

Um método rápido e simples para a determinação de isoniazida foi desenvolvido com um sistema de análise por injeção em fluxo (FIA) usando um eletrodo impresso (EI) de carbono modificado com hexacianoferrato de prata (Ag-HCF) como detector amperométrico. A isoniazida (INZ) é um agente anti tuberculástico frequentemente utilizado para fins clínicos. Devido aos acidentes de intoxicação levarem a morte, a determinação de níveis deste fármaco em fluidos do corpo humano é vital para verificar a eficácia das doses terapêuticas e tóxicas. A utilização dos eletrodos impressos para desenvolvimento de sensores eletroquímicos baseados na utilização de Eletrodos Quimicamente Modificados tem mostrado um progresso significativo nos últimos anos. Além disso, nanomateriais apresentam características químicas, físicas, e eletroquímicas interessantes devido ao seu pequeno tamanho. Várias vantagens têm sido relatadas usando as características eletroquímicas de métodos eletroanalíticos convencionais (por exemplo: uma alta sensibilidade, baixo custo, e detecção rápida) combinadas as propriedades de nanomateriais (por exemplo: área de superfície elevada, os planos de cristalinas mais expostas do que o material a granel, a melhoria do processo de transporte de massa). Devido estas vantagens, nanopartículas metálicas, como por exemplo, nanopartículas de prata (NPAg) tem sido empregadas como modificadores de eletrodos no desenvolvimento de sensores. Nanopartículas metálicas, em especial NPAg, também são empregadas como substrato para deposição de mediadores de espécies redox. Uma subclasse importante de modificadores de eletrodos e mediadores redox consiste nos hexacianoferratos metálicos, um análogo do azul da Prússia. Reações eletroquímicas de várias espécies podem ser catalisadas empregando estes análogos, recebendo assim uma atenção considerável para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos. Neste trabalho, as nanopartículas de prata foram depositadas na superfície do eletrodo de carbono impresso e utilizadas como precursores para a preparação eletroquímica de hexacianoferrato de prata (Ag-HCF). O comportamento eletroquímico de nanopartículas e do Ag-HCF foi estudado por voltametria cíclica. O perfil voltamétrico verificado na presença de íons potássio ou prata, exibiu uma forte dependência com a natureza do cátion usado. O eletrodo EI-Ag-HCF exibiu uma resposta catalítica na presença de INZ. Foi observado que a corrente anódica do par redox $\text{Ag}_3\text{K}[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]/\text{Ag}_3[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]$ na superfície do eletrodo aumenta proporcionalmente com a concentração de INZ, viabilizando assim a avaliação do dispositivo como um sensor amperométrico em um sistema FIA. Os parâmetros empregados nas análises foram otimizados e as melhores condições de operação foram empregados. Uma curva de calibração foi construída, obtendo uma região linear de $5,0 \times 10^{-6}$ a $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, um limite de detecção de $2,6 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e uma frequência analítica de 24 injeções por hora foi alcançada. O eletrodo construído apresentou resultados repetitivos e reprodutíveis e o método desenvolvido foi aplicado com sucesso na determinação de INZ em amostras de urina humana simuladas com boa concordância entre os valores adicionados e recuperados, apresentando um índice de recuperação de 105,9%.

ABSTRACT

A rapid and simple method was developed for isoniazid (INZ) determination by flow injection analysis (FIA) using a screen-printed carbon electrode (SPCE) modified with silver hexacyanoferrates (Ag-HCF) as amperometric detector. Isoniazid (INZ) is a tuberculostatic agent widely used for clinical purposes. Owing to poisoning accidents even death, the assay of INZ level in human body fluids is vital for effective therapeutic and toxic dosages. The main advantage of screen-printed electrodes (SPE) over conventional electrodes is that the problems of carry over and surface fouling is minimized. The use of the screen-printed electrodes for development of electrochemical sensors based on the use of chemical modified electrodes has shown significant progress in the previous years. In addition, nanomaterials offer specific physical, chemical, and electrochemical properties owing to their small size. Several advantages have been realized by using the combined electrochemical characteristics of conventional electroanalytical methods (e.g: high sensitivity, low cost, and rapid detection) and the properties of nanomaterials (e.g: high surface area, crystalline plans more exposed than bulk material, enhancement of mass transport process). An important subclass of the modified electrodes consists of the insoluble transition-metal hexacyanides. Several electrochemical reactions that can be catalyzed by Prussian blue analogues have received considerable attention for electrochemical sensor development. In this work, silver nanoparticles were deposited on the surface of the screen-printed carbon electrode and used as precursors for the electrochemical hexacyanoferrates preparation (Ag-HCF). The electrochemical behavior of both silver nanoparticles and silver hexacyanoferrates was studied by cyclic voltammetry. The voltammetric profile was verified in the presence of potassium or silver ions, and a strong dependence with the nature of the cations was observed. The SPCE/Ag-HCF electrode exhibits a catalytic response in the presence of INZ. It was observed that the anodic current of the $\text{Ag}_3\text{K}[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]/\text{Ag}_3[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]$ redox couple at the electrode surface increases proportionally to the INZ concentration. The device was evaluated as an amperometric sensor in an FIA system. Using the best operation conditions assigned as: potential applied of +0.45V, pH 3.0, flow rate of 2.9 mL min^{-1} , sample volume of $200 \text{ }\mu\text{L}$, and analytical path of 30 cm, it was possible to construct a linear calibration curve from 5.0×10^{-6} to $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ with a limit of detection of $2.6 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ and an analytical frequency of 24 injections per hour was achieved. The method was successfully applied for the determination of INZ in simulated human urine samples with good agreement between the added and recovery values.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - A) Processo de construção do eletrodo impresso através do método de silk screen; B) Configuração do arranjo dos eletrodos impressos após o procedimento empregado na Figura 1A. | 24 |
| Figura 2 - Representação esquemática de um eletrodo impresso e seus componentes, onde A = eletrodo auxiliar, W = eletrodo de trabalho, R = eletrodo de referência e C = contato elétrico..... | 25 |
| Figura 3 - Representação esquemática do processo de passivação através da: A) repulsão eletrostática; B) Impedimento estérico. | 34 |
| Figura 4 - Esquema de um conjunto de difusão de NPs, Caso1: difusão radial de uma única partícula isolada, com difusão radial menor do que o raio da NP; Caso 2: Difusão convergente entre duas nanopartículas adjacentes, porém com difusão radial independente; Caso 3: Difusão parcialmente sobrepostas entre duas NPs adjacentes mais próximas em comparação ao Caso 2; Caso 4: Forte sobreposição das camadas de difusão levando a uma difusão linear da matriz como um todo..... | 35 |
| Figura 5 - Perfis voltamétrico para o eletrodo modificado com NPAg, A) 0,3%, B) 3,5%, e C) 10,2%..... | 35 |
| Figura 6 - Estrutura proposta para o Azul da Prússia. | 40 |
| Figura 7 - Estrutura proposta para o AgHCF..... | 41 |
| Figura 8 - Possível mecanismo EC' proposto para uma reação de oxidação utilizando o AgHCF. | 42 |
| Figura 9 - Configuração geral de um sistema em fluxo. 1- sistema de propulsão, 2- sistema de injeção, 3- reator-R, 4- sistema de detecção, Descarte de amostra e reagentes..... | 45 |
| Figura 10 - Estrutura molecular da isoniazida (INZ). | 49 |

| | |
|---|----|
| Figura 11 - Representação esquemática da síntese das NPAg. | 53 |
| Figura 12 - Eletrodos impressos produzidos pela Oxley development, onde ET - eletrodo de trabalho ($\phi = 2$ mm), ER - eletrodo de referência e EA - eletrodo auxiliar ou contra eletrodo. | 55 |
| Figura 13 - A) Configuração da célula eletroquímica utilizada; B) Configuração do sistema FIA utilizado na realização das análises. | 62 |
| Figura 14 - Difratoograma de Raios-X referente as NPAg, angulação do feixe igual a 2θ | 65 |
| Figura 15 - Gráfico da distribuição percentual em função do diâmetro das NPAg obtido através da técnica de DLS. | 67 |
| Figura 16 - Imagens de MEV da superfície dos eletrodos; A) EI não modificado, e B) EI modificado com NPAg, para a resolução de 5 mil vezes; C) EI não modificado, D) EI modificado com NPAg, para a resolução de 10 mil vezes, E) EI-AgHCF resolução de 10 mil vezes, e F) EI-AgHCF resolução de 5 mil vezes. | 69 |
| Figura 17 - Espectro de Energia Dispersiva (EDX) referente à composição química A) EI não modificado; B) EI-NPAg; C) EI-AgHCF. | 71 |
| Figura 18 - Espectro Raman para o eletrodo modificado com NPAg (—) e para o eletrodo modificado com AgHCF sobre as NPAg (—). | 73 |
| Figura 19 - Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ para os eletrodos de carbono vítreo não modificado (ECV) e modificado com nanopartículas de prata (ECV-NPAg). | 75 |
| Figura 20 - Voltamogramas cíclicos obtidos para os eletrodos: ECV-NPAg (—) e eletrodo de prata Bulk (—), em solução de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, utilizando uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} | 76 |

- Figura 21** - Voltamogramas cíclicos sucessivos obtidos para o ECV-NPAG em meio de NaOH 0,10 mol L⁻¹, a uma velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹. ... 77
- Figura 22** - Voltamogramas obtidos do ECV no processo de formação eletroquímica de NPAG em meio de KNO₃ 0,10 mol L⁻¹ e AgNO₃ 5,0x10⁻⁵ mol L⁻¹ a 100 mV s⁻¹. 79
- Figura 23** - Voltamogramas cíclicos obtidos para os eletrodos ECV-NPAG_{elet} em NaOH 0,10 mol L⁻¹, a uma velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹. 80
- Figura 24** - Voltamogramas cíclicos obtidos para o ECV-NPAG, na ausência e na presença de 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ de glicerol, em NaOH 0,10 mol L⁻¹, a 100 mV s⁻¹. 81
- Figura 25** - Curvas de titulação potenciométrica de íons cloreto usando como titulante AgNO₃ 0,0485 mol L⁻¹ para eletrodos de prata Bulk e ECV-NPAG. 83
- Figura 26** - A) Voltamogramas cíclicos obtidos para o ECV-NPAG, em solução contendo K₃[Fe(CN)₆] 1,0x10⁻³ mol L⁻¹, durante a etapa de formação do AgHCF, B) Voltamogramas cíclicos obtidos para o mesmo eletrodo em solução de KNO₃ 0,10 mol L⁻¹, após tratamento realizado em A. 85
- Figura 27** - A) Curva de E vs tempo referente a formação do AgHCF sobre as NPAG em solução contendo K₃[Fe(CN)₆] 1,0x10⁻³ mol L⁻¹ e KNO₃ 0,10 mol L⁻¹, B) Voltamograma cíclico obtido para o eletrodo modificado com AgHCF, através do método galvanostático, em solução de KNO₃ 0,10 mol L⁻¹. 86
- Figura 28** - A) Voltamogramas cíclicos obtidos para os eletrodos modificados com AgHCF, através do método galvanostático empregando diferentes intensidades de corrente, em solução de KNO₃ 0,10 mol L⁻¹. B) Variação da corrente de pico anódica, em função da corrente utilizada no procedimento galvanostático. 87
- Figura 29** - Variação da corrente de pico anódica, em função do tempo utilizado no procedimento galvanostático. 88
-

- Figura 30** - Voltamogramas cíclicos obtidos em solução $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de KNO_3 , para eletrodos submetidos à deposição de AgHCF, com tempos de 60 s e 300 s. 89
- Figura 31** - Variação da intensidade do pico de corrente anódica, em função dos diferentes valores de pH utilizados para a deposição do AgHCF. 89
- Figura 32** - Voltamogramas cíclicos obtidos em meio de KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, a 50 mV s^{-1} , para o substrato sem modificação e modificado com NPAg, antes e após a formação do AgHCF, A) ITO, e B) EI..... 90
- Figura 33** - A) Gráfico em colunas da repetibilidade do perfil voltamétrico do AgHCF para o mesmo eletrodo; B) Gráfico em colunas da reprodutibilidade do perfil voltamétrico do EI-AgHCF para diferentes eletrodos. 91
- Figura 34** - Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo EI-AgHCF na presença de KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e AgNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ 93
- Figura 35** - A) Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura do eletrodo EI-AgHCF, em solução de KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, B) Curvas de correlação entre as correntes de pico anódicas (I_{pa}) e catódicas (I_{pc}), em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$). 94
- Figura 36** - Voltamogramas cíclicos normalizados de I_{pa} e I_{pc} em função do tempo. 95
- Figura 37** - Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ para o EI-AgHCF, na ausência e na presença de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de isoniaziada, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ 96
- Figura 38** - Mecanismo proposto para o funcionamento do EI-AgHCF na presença de INZ..... 97
- Figura 39** - Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, para o EI-AgHCF, em diferentes concentrações de INZ: (—) Ausência de INZ,
-

$4,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (—), $9,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (—) e $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (—), $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.
Curva Analítica em detalhe. 98

Figura 40 - A) Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de KNO_3 para um EI-AgHCF utilizando diferentes eletrodos de referência; B) Voltamograma cíclico ilustrando os valores de potencial aplicado. $v = 50 \text{ mV}$
..... 100

Figura 41 - A) Sinais transientes obtidos para diferentes valores de potencial: 300 mV (a), 350 mV (b), 450 mV (c), 500 mV (d) e 550 mV (e); aplicados para três injeções consecutivas de INZ e; B) Intensidade da média das correntes e seus respectivos desvios em função do potencial aplicado. $C_{\text{INZ}} = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, vazão de $2,9 \text{ mL min}^{-1}$ e volume injetado de $200 \mu\text{L}$ 101

Figura 42 - A) Sinais transientes obtidos para diferentes valores de volume da alça de amostragem para três injeções consecutivas de INZ e; B) Variação do sinal transiente de corrente em função dos diferentes volumes de alça de amostragem. $C_{\text{INZ}} = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, vazão de $2,9 \text{ mL min}^{-1}$ e potencial aplicado +450 mV..... 102

Figura 43 - A) Sinais transientes obtidos para diferentes valores de vazão: $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ (a), $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ (b), $2,9 \text{ mL min}^{-1}$ (c) e $3,7 \text{ mL min}^{-1}$ (d); para três injeções consecutivas de INZ e; B) Variação do transiente de corrente em função das diferentes vazões utilizadas. $C_{\text{INZ}} = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, potencial aplicado +450 mV e volume injetado de $200 \mu\text{L}$ 103

Figura 44 - Sinais transientes obtidos para injeção de diferentes concentrações de INZ nas condições otimizadas. $C_{\text{INZ}} =$ (a) $5,0 \times 10^{-6}$, (b) $1,0 \times 10^{-5}$, (c) $5,0 \times 10^{-5}$, (d) $1,0 \times 10^{-4}$, (e) $3,0 \times 10^{-4}$ e (f) $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ 104

Figura 45 - Curvas Analíticas obtidas com diferentes concentrações de INZ utilizando um sistema FIA para os EI não modificado e EI-AgHCF..... 105

Figura 46 - Sinais transientes obtidos nos estudos de interferentes para as espécies: A – Dopamina (DA); B- Ácido Ascórbico; C – Glicose e D – Rifampicina. Foram injetadas soluções contendo $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de INZ e os

interferentes em diferentes concentrações: a – ausência do interferente, b – $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, c – $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e d – $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ 108

Figura 47 - Sinais transientes obtidos na determinação de INZ. Injeções contendo concentrações conhecidas de INZ de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (a), $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (b), $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (c) $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e (d) $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Amostra de urina sintética enriquecida (S). 110

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-------------------|--|-----|
| Tabela 1 - | Especificação dos reagentes utilizados nos experimentos. | 52 |
| Tabela 2 - | Parâmetros para deposição AgHCF através do método galvanostático. | 90 |
| Tabela 3 - | Valores com os valores dos parâmetros e otimizados..... | 104 |
| Tabela 4 - | Parâmetros analíticos obtidos na calibração dos EI não modificado (EINM) e EI-AgHCF. | 106 |
| Tabela 5 - | Porcentagem de interferência no valor do transiente registrada para os concomitantes avaliados. | 109 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | | |
|-----------------------|---|---|
| AA | - | Ácido ascórbico |
| AgHCF | - | Hexacianoferrato de prata |
| b | - | Sensibilidade (coeficiente angular da reta) |
| C _{impresso} | - | Eletrodo impresso com tinta a base de carbono |
| cfc | - | Cúbico de face centrada |
| CNT | - | Nanotubo de carbono |
| CsHCF | - | Hexacianoferrato de cério |
| CuHCF | - | Hexacianoferrato de cobre |
| DA | - | Dopamina |
| DLS | - | Técnica de espalhamento dinâmico de luz, do inglês <i>Dynamic Light Scattering</i> |
| E | - | Potencial |
| EA | - | Eletrodo auxiliar (contra eletrodo) |
| EI | - | Eletrodo impresso |
| EINM | - | Eletrodo impresso não modificado |
| ECP | - | Eletrodo de carbono pirolítico |
| ECV | - | Eletrodo de carbono vítreo |
| EDS | - | Técnica de espectroscopia de energia dispersiva; do inglês <i>Energy Dispersive Spectroscopy</i> |
| EQM | - | Eletrodo quimicamente modificado |
| ER | - | Eletrodo de referência |
| ET | - | Eletrodo de trabalho |
| EC' | - | Processo eletroquímico – químico catalítico |
| F | - | Constante de Faraday |
| HCF | - | Hexacianoferrato |
| hkl | - | Planos 3 D da estrutura de um sólido cristalino |
| INZ | - | Isoniazida |
| I _{pa} | - | Corrente de pico anódico |
| I _{pc} | - | Corrente de pico catódico |
| ITO | - | Vidro modificado com óxido de estanho dopado com índio |

| | | |
|------------------|---|---|
| LOD | - | Limite de detecção |
| LDR | - | Faixa linear de trabalho (concentração) |
| MHCF | - | Hexacianoferrato metálico |
| MET | - | Técnica de microscopia eletrônica de transmissão |
| MEV | - | Técnica de microscopia eletrônica de varredura |
| MWCNT | - | Nanotubos de carbono “multi walled” |
| NiHCF | - | Hexacianoferrato de níquel |
| NPs | - | Nanopartículas |
| NPAg | - | Nanopartícula de prata |
| NPAu | - | Nanopartícula de ouro |
| NPMs | - | Nanopartículas metálicas |
| NPPt | - | Nanopartícula de platina |
| Q_{lpa} | - | Carga do pico de corrente anódica |
| Q_{lpc} | - | Carga do pico de corrente catódica |
| Q_m | - | Carga média entre os processos (anódico e catódico) |
| RIF | - | Rifampicina |
| S | - | Desvio padrão do branco |
| TIHCF | - | Hexacianoferrato de tálio |
| TmHCF | - | Hexacianoferrato de túlio |
| $v^{1/2}$ | - | Raiz quadrada da velocidade de varredura |
| VC | - | Voltametria cíclica |
| VPD | - | Voltametria de pulso diferencial |
| ϕ | - | Diâmetro da superfície eletródica |
| ΔI_{pa} | - | Variação da intensidade de corrente anódica |
| Γ_{AgHCF} | - | Estimativa da quantidade de material modificador |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|--|----|
| 1. | INTRODUÇÃO | 20 |
| 1.1. | Sensores eletroquímicos..... | 20 |
| 1.2. | Eletrodos Impressos e Eletrodos Quimicamente Modificados | 23 |
| 1.2.1 | Nanopartículas Metálicas | 31 |
| 1.2.2 | Hexacianoferratos Metálicos | 39 |
| 1.3 | Análise por Injeção em Fluxo | 44 |
| 1.4 | Isoniazida (INZ)..... | 48 |
| 2. | OBJETIVOS | 51 |
| 2.1. | Objetivo geral | 51 |
| 2.2 | Etapas propostas | 51 |
| 3. | PARTE EXPERIMENTAL..... | 52 |
| 3.1 | Reagentes..... | 52 |
| 3.2 | Procedimento experimental..... | 53 |
| 3.2.1 | Síntese das nanopartículas de prata | 53 |
| 3.2.2 | Caracterização estrutural das NPAg por difração de Raio X | 54 |
| 3.2.3 | Caracterização das NPAg por Espalhamento dinâmico de luz (DLS) . | 54 |
| 3.2.4 | Preparação dos Eletrodos Quimicamente Modificados | 55 |
| 3.3 | Caracterização dos Eletrodos Modificados | 57 |
| 3.3.1 | Medidas de Espectroscopia Raman | 57 |
| 3.3.2 | Medidas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raio X (EDS ou EDX) | 57 |
| 3.4 | Medidas potenciométricas..... | 58 |
| 3.5 | Medidas Voltamétricas | 58 |
| 3.5.1 | Caracterização eletroquímica de NPAg quimicamente sintetizadas.... | 59 |
| 3.5.2 | Medidas voltamétricas na presença de glicerol | 59 |
| 3.5.3 | Caracterização voltamétrica dos eletrodos modificados com AgHCF . | 59 |
| 3.5.4 | Verificação da potencialidade analítica do eletrodo modificado com AgHCF como sensor para isoniazida (INZ) | 61 |
| 3.6 | Determinação amperométrica de INZ empregando um sistema de Análise por Injeção em Fluxo (FIA) | 62 |
| 3.6.1 | Otimização dos parâmetros empregados no sistema FIA | 63 |
| 3.6.2 | Construção da curva analítica para a determinação de INZ utilizando o sistema FIA | 63 |
| 3.6.3 | Estudo de possíveis interferentes..... | 64 |
| 3.6.4 | Determinação de INZ em uma amostra de urina sintética enriquecida | 64 |
| 4. | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 65 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 4.1. | Caracterização da estrutura e tamanho das nanopartículas de prata (NPAg) | 65 |
| 4.1.1. | Análise das NPAg por Difração de Raio-X | 65 |
| 4.1.2. | Análise das NPAg por Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)..... | 66 |
| 4.2 | Caracterização dos eletrodos..... | 68 |
| 4.2.1 | Caracterização da morfologia e da composição química superficial dos eletrodos não modificados e modificados | 68 |
| 4.2.2 | Espectroscopia Raman dos eletrodos não modificados e modificados por AgHCF | 72 |
| 4.3 | Caracterização do comportamento voltamétrico dos eletrodos modificados com NPAg | 74 |
| 4.4 | Caracterização do comportamento potenciométrico dos eletrodos modificados com NPAg | 82 |
| 4.5 | Preparação e caracterização voltamétrica de Eletrodos modificados com AgHCF | 84 |
| 4.6 | Avaliação da potencialidade analítica dos Eletrodos modificados com AgHCF | 96 |
| 4.7 | Determinação amperométrica de INZ empregando um sistema de análise por injeção em fluxo (FIA) | 99 |
| 4.7.1 | Otimização dos parâmetros empregados na determinação por FIA.... | 99 |
| 4.7.2 | Efeito de espécies concomitantes na resposta amperométrica do detector e aplicação do método proposto | 107 |
| 5. | CONCLUSÕES | 112 |
| 6. | REFERÊNCIAS | 114 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sensores eletroquímicos

Um sensor, em linhas gerais, pode ser definido como um dispositivo que emprega um elemento de reconhecimento que está acoplado a um transdutor. O elemento de reconhecimento é o responsável pela interação seletiva com o analito de interesse, o qual é detectado pela medida de alguma propriedade física ou química, permitindo o monitoramento da espécie de interesse [1]. Idealmente, sensores devem funcionar de maneira contínua e reversível e realizar a medição diretamente na matriz da amostra, sem a necessidade de preparação prévia.

Existem diversos tipos de sensores, como por exemplo: sensores térmicos, onde a variação do sinal é dada em função da variação da temperatura; sensores ópticos, onde o sinal observado depende da intensidade e/ou variação da luminosidade; sensores capacitivos, onde as medidas são baseadas na variação da capacitância de um determinado material; sensores colorimétricos, como o próprio nome diz, baseiam-se na medida de cor da solução analisada; e sensores eletroquímicos, que são dispositivos onde a resposta é baseada na medida de alguma propriedade elétrica do sistema.

Dentre os sensores eletroquímicos, merecem destaque os condutométricos, impedimétricos, potenciométricos e voltamétricos (amperométricos). Sensores condutométricos são baseados na variação da condutância elétrica de soluções iônicas e/ou sólidos [2]. Gonchar e colaboradores desenvolveram um biossensor condutométrico para a determinação de formaldeído utilizando como modificador a enzima formaldeído desidrogenase. A modificação deu-se através da mistura da enzima com uma membrana biosseletiva, que foi incorporada à superfície do eletrodo de ouro. O biossensor empregado apresentou uma boa correlação

entre os valores de concentração estudados, demonstrando, assim, potencialidade para seu emprego na determinação de formaldeído em amostras reais [3].

Nos sensores impedimétricos a medida é realizada pela variação da impedância (resistência à transferência de carga) do sistema. Cosnier e colaboradores [4] desenvolveram um imunossensor para a detecção impedimétrica de atrazina. O eletrodo consiste na modificação da superfície de um eletrodo de ouro com filme de polipirrol incorporado com anticorpo anti-atrazina. O eletrodo foi caracterizado por voltametria cíclica e posteriormente aplicado na determinação de atrazina através da técnica de impedância, onde um limite de detecção baixo, 10 pg mL^{-1} , foi relatado.

Sensores potenciométricos [5, 6] operam em condições experimentais muito simples utilizando um sistema de dois eletrodos (indicador e de referência). A resposta é baseada em uma variação de potencial elétrico, causada pela presença do analito na superfície do eletrodo indicador. O exemplo mais difundido de sensor potenciométrico é o eletrodo de vidro sensível ao pH, que é utilizado em diversas áreas, como agropecuária, indústrias, análises laboratoriais, entre outras. O sensor de pH geralmente é constituído por um eletrodo de vidro combinado, onde o potencial elétrico é desenvolvido na superfície de uma membrana de vidro sinterizado. Outros eletrodos podem ser empregados como sensores potenciométricos, como os eletrodos metálicos, eletrodos inertes, como por exemplo, carbono e platina; membranas cristalinas e poliméricas.

Sousa e Trancoso [7] desenvolveram um método para a determinação direta do teor de flúor em águas residuais empregando um eletrodo potenciométrico. Para a modificação do eletrodo, foi utilizada uma membrana seletiva a flúor, composta por fluoreto de lantânio (LaF_3), dopada com fluoreto de európio (EuF_3). Empregando este método, pode-se calcular uma quantidade relativamente pequena com uma boa confiança, $2,17 \pm 0,42 \text{ mg F L}^{-1}$.

Os sensores amperométricos funcionam empregando uma célula constituída de 3 eletrodos (de trabalho, contra eletrodo e de referência), onde a medida é fundamentada na aplicação de uma diferença de potencial imposta a um eletrodo de trabalho, o que proporciona a oxidação ou redução da espécie

eletroativa sobre sua superfície, sendo a corrente resultante desse processo proporcional à concentração do analito. Desta forma, torna-se possível quantificar a espécie de interesse. A aplicação do potencial pode ser constante durante a medida, no caso do sensor amperométrico [8], ou ainda ser realizada empregando-se uma varredura de potencial, sendo considerados sensores voltamétricos [9].

Bergamini e colaboradores [10] desenvolveram um método para estimar a quantidade de antioxidantes presentes em vinhos, empregando um sensor voltamétrico baseado na oxidação do ácido gálico. O eletrodo utilizado consistiu em um eletrodo de pasta de carbono modificado com nanotubos de carbono. A determinação dos antioxidantes foi realizada empregando a técnica de voltametria de pulso diferencial, onde uma faixa linear de trabalho que varia de $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, e um limite de detecção de $3,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ foram relatados pelos autores.

Ho e colaboradores [11] desenvolveram um método de determinação indireta de colesterol, utilizando espécies de brometo em meio orgânico, empregando um sensor amperométrico de platina. A utilização do brometo em solução é justificada devido ao fato do colesterol não ser oxidado pelo eletrodo de platina nas condições e meio utilizados. A determinação de colesterol foi realizada em meio de DMF, brometo de potássio (KBr) e perclorato de sódio (NaClO_4). Através das análises para a determinação amperométrica de colesterol obteve-se uma curva analítica variando a faixa de concentração de $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$, o que demonstra a viabilidade na determinação de colesterol em alimentos processados.

Uma avaliação dos métodos eletroanalíticos propostos atualmente torna possível verificar a busca por equipamentos com maior robustez, além de métodos e procedimentos mais simples. Adicionalmente, adaptações no tamanho e arranjo de eletrodos são frequentemente relatadas, visando análise em campo ou a coleta do analito no eletrodo para uma análise posterior [12, 13]. Assim, os sensores desenvolvidos nos últimos anos permitem ao operador não só realizar análises com instrumentos mais baratos, com boa resistência mecânica, reprodutibilidade, respostas sensíveis e seletivas, além de facilidade de uso e simplicidade operacional. Dentro deste contexto, o desenvolvimento

de eletrodos impressos (EI), “screen-printed electrode” [14-17], tem atendido a demanda desse mercado, oferecendo um completo sistema de eletrodos projetados com grande simplicidade e economia, ou seja, dispositivos na forma de um único arranjo contendo os eletrodos de trabalho, auxiliar e de referência impressos no mesmo suporte. São dispositivos de baixo custo e tão funcionais que permitem a comercialização na forma de eletrodos descartáveis. Como consequência, têm mostrado alta versatilidade em aplicações, tanto na forma de eletrodos convencionais, quanto na forma de eletrodos modificados [18-25].

1.2. Eletrodos Impressos e Eletrodos Quimicamente Modificados

Eletrodos impressos (EI) consistem em dispositivos planares preparados com diferentes camadas de tintas. A construção desses dispositivos pode ser feita de diferentes formas e métodos, onde a confecção consiste basicamente na deposição de uma tinta condutora sobre um substrato inerte, sendo a área do eletrodo delimitada por uma tinta isolante. O processo de manufatura desses eletrodos apresenta vantagens tais como simplicidade, baixo custo e rapidez.

A confecção de eletrodos impressos pode ser realizada por diferentes métodos, como por exemplo, a deposição das tintas condutoras por spray (aerossol), onde a incorporação ocorre pela simples aplicação de um spray de uma tinta condutora; deposição por impressão por jato de tinta (Inkjet), realizada através do emprego de uma impressora comum, utilizada na impressão de papéis e documentos. Nesse sentido, Dawson e colaboradores [26] realizaram a construção de um dispositivo impresso aplicado na confecção de LEDs, a partir da deposição de uma tinta comercial de prata, utilizando uma impressora comercial no processo de deposição da tinta condutora.

Outro método de produção de eletrodos impressos consiste na deposição por litografia, que é uma técnica bastante precisa e capaz de formar estruturas em escala de até 100 nm. Essa técnica envolve a deposição de um filme condutor sobre um substrato e sobre esse filme é depositada uma segunda camada de uma tinta isolante foto resistiva. Posteriormente se incide uma luz adequada sobre a camada de tinta foto resistiva, degradando a tinta

isolante. A área do eletrodo é delimitada empregando máscaras que impedem a chegada da luz até a superfície da tinta, formando assim o eletrodo impresso. Após a obtenção deste dispositivo, o eletrodo pode passar por outros processos como, por exemplo, gravura, retirada, deposição das camadas obtendo-se assim, novas configurações [27].

Dentre as diversas técnicas empregadas na confecção de eletrodos e/ou dispositivos impressos, o método mais difundido é a técnica de silk screen, comumente usada no processo de incorporação de estampas em camisetas. O processo de silk-screen baseia-se na simples incorporação das tintas, empregando uma tela vazada adequada para o processo, onde a área do eletrodo é delimitada. A passagem da tinta condutora pela tela fornece a configuração e a dimensão pretendidas para o eletrodo sobre a superfície do substrato. O processo de confecção do eletrodo impresso pelo método de silk screen pode ser observado na Figura 1A e 1B.

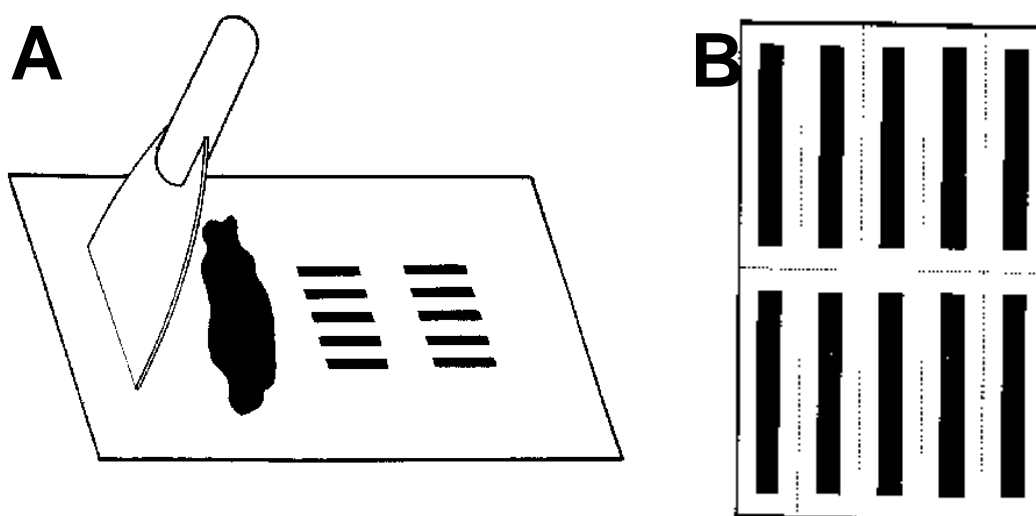


Figura 1 - A) Processo de construção do eletrodo impresso através do método de silk screen; B) Configuração do arranjo dos eletrodos impressos após o procedimento empregado na Figura 1A. [28]

Para a confecção desses dispositivos, diversos materiais são utilizados como substratos para a deposição das tintas condutoras e isolantes, como por exemplo, poliéster, policloreto de vinila (PVC), materiais cerâmicos, alumina, fibra de vidro, poliamida, entre outros [29].

A tinta condutora empregada na fabricação desses dispositivos é basicamente constituída por um material condutor, que pode ser um metal, como ouro, prata, platina, etc; ou também a base de carbono, como grafite ou negro de fumo. Um material aglutinante tem a função de dar a consistência desejada à tinta e permitir a formação de um filme, sendo o acetato de celulose o aglutinante mais comumente empregado. Além dos componentes básicos, a tinta empregada na confecção de um EI deve apresentar determinadas características importantes para poder servir de base na fabricação de eletrodos em geral, como:

- Viscosidade: deve ser adequada ao processo de “screen-printing” empregado. Sendo que depende diretamente da natureza do aglutinante, levando em consideração a pureza e característica do solvente empregado;
- Aderência: a tinta deve permitir uma fixação efetiva do filme ao suporte, evitando a fácil remoção ou lixiviação da mesma;
- Flexibilidade: a tinta deve apresentar uma boa flexibilidade, com o intuito de prevenir possíveis rachaduras na superfície do eletrodo, principalmente quando há a utilização de suportes flexíveis, como por exemplo, PVC,
- Resistividade elétrica: devido à tinta ser utilizada como um condutor elétrico, a sua resistividade deve ser a mais baixa possível [28].

A Figura 2 mostra o esquema representativo de um eletrodo impresso comercial e seus componentes.

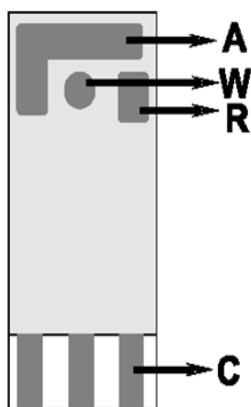


Figura 2 - Representação esquemática de um eletrodo impresso e seus componentes, onde A = eletrodo auxiliar, W = eletrodo de trabalho, R = eletrodo de referência e C = contato elétrico.

O eletrodo impresso mostrado na Figura 2 consiste em um esquema composto por um arranjo de três eletrodos: eletrodo auxiliar ou contra eletrodo (A), eletrodo de trabalho (W) e eletrodo de referência (R), além dos contatos elétricos na outra extremidade (C), utilizando uma tinta condutora a base de carbono impressa sobre um suporte cerâmico. A área do contato elétrico e os eletrodos constituintes do dispositivo estão delimitados por uma tinta isolante em cinza mais claro.

O desenvolvimento de sensores baseados no uso de EI permite a produção em massa e a comercialização de eletrodos de custo relativamente baixo, para as mais diversas aplicações. Do ponto de vista acadêmico, serve de estímulo na busca por novas tintas condutoras, suportes, configurações, formas de preparação e aplicações [29, 30].

Os eletrodos impressos têm sido amplamente empregados como uma alternativa de sucesso ao uso de eletrodos convencionais (eletrodos de mercúrio, carbono vítreo, pasta de carbono, ouro, platina, prata e outros) em eletroanálises, cuja substituição apresenta a vantagem de oferecer sistemas mais simples, menores, mais compactos e descartáveis, o que diminui as etapas de limpeza entre as análises, envenenamento da superfície e oferecem simplicidade no desenvolvimento de sensores portáteis [29-33].

Gil e colaboradores [34] realizaram a determinação de mercúrio em água, utilizando a técnica de voltametria de redissolução anódica por onda quadrada, empregando um eletrodo impresso comercial, onde o eletrodo de trabalho era composto por uma tinta a base de ouro. O método foi aplicado em amostras de efluentes industriais, obtendo-se um limite de detecção de $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$. A validação foi realizada por um estudo comparativo com amostra certificada, sendo relatadas recuperações de 97,1% e 111,1%, mostrando um método confiável e possivelmente aplicável no monitoramento de análises de efluentes.

Moreno e colaboradores [35] realizaram um estudo para a determinação de dopamina na presença de ácido ascórbico, empregando um eletrodo impresso modificado com nanotubos de carbono (CNT). Para as análises, foi utilizado um EI comercial modificado com CNT, funcionalizado com grupos carboxílicos. O eletrodo modificado foi empregado na determinação de

dopamina (DA) na presença de ácido ascórbico (AA), onde foi observada uma boa separação entre os picos referentes aos processos de oxidação, usando voltametria de pulso diferencial. Um limite de detecção de $1,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e uma faixa linear de trabalho de $5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ à $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ foi relatada para o analito.

Hart e colaboradores [36] desenvolveram um sensor para determinações de álcool em cerveja. O sensor consiste em um eletrodo impresso modificado com ftalocianina de cobalto, onde o modificador responde a H_2O_2 , que é produto da oxidação enzimática do álcool pela enzima álcool oxidase. A determinação de etanol foi realizada através da técnica de amperometria, empregando o eletrodo impresso modificado na presença da enzima, onde se obteve um erro de 0,64%. Os valores em porcentagem de etanol rotulados (5%) diferiram em apenas 7,63% dos valores encontrados nas análises empregando o eletrodo impresso modificado.

A versatilidade e a aplicabilidade desses sensores podem ser comprometidas devido a possível passivação gradual da superfície eletródica, principalmente devido à adsorção de produtos das reações de oxi-redução. Além disso, em diversas situações a resposta com relação ao composto de interesse não apresenta potencial analítico suficiente para ser adequadamente aplicado, isso devido às limitações das características desses eletrodos e/ou processos, como baixas sensibilidade e seletividade. Uma alternativa para tentar superar essas limitações e promover um aumento na aplicabilidade e na eficiência dos dispositivos consiste na modificação química das superfícies formando, assim, um Eletrodo Quimicamente Modificado (EQM), definido por Murray e col. [29-32].

A modificação de eletrodos tem como principal finalidade pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo-solução, como forma de alterar a reatividade e a seletividade do sensor base, favorecendo assim, o desenvolvimento de eletrodos para vários fins e aplicações [37-39]. Os EQMs podem melhorar a resposta com relação a eletrodos não modificados por diferentes mecanismos, como a eletrocatalise de reações redox (para compostos orgânicos e inorgânicos), a pré-concentração de analitos, a exclusão de interferentes e outros [40].

A utilização de espécies na superfície do eletrodo auxilia na melhora da sensibilidade para analitos diversos, pois as espécies confinadas na superfície do eletrodo podem atuar no sentido de promover uma pré-concentração seletiva do analito, o que causa uma melhora no sinal. As interações podem ocorrer por diversos mecanismos, como por exemplo, complexação, troca iônica, ligação covalente, entre outras [40]. Além disso, os modificadores podem promover o fenômeno de eletrocatalise, que tem por finalidade uma diminuição da energia de ativação de uma determinada reação redox, reduzindo assim o sobrepotencial de ativação necessário. Esse comportamento geralmente provoca uma melhora na seletividade da medida, pois permite trabalhar com potenciais de operação mais baixos, ou seja, menos positivos e/ou menos negativos. Outro aspecto que deve ser levado em conta, é que, em alguns casos, o modificador promove um aumento da resposta do analito sem necessariamente diminuir o sobrepotencial; nessa situação tem-se uma melhora na sensibilidade. A exclusão de interferentes consiste em coibir a ação dos interferentes que inibem ou mascaram a resposta eletroquímica da espécie de interesse, utilizando geralmente membranas seletivas como método físico e também através da formação de monocamadas que sejam seletivas [41].

Telefoncu e colaboradores [42] desenvolveram um sensor para a determinação de dopamina (DA) na presença de alta concentração de ácido ascórbico. Para as análises foi empregado um eletrodo de pasta de carbono modificado com membrana de Nafion e clinoptilonita. As análises para a determinação de DA foram realizadas por redissolução anódica empregando as técnicas de voltametria cíclica e de pulso diferencial. A pré-concentração da DA foi feita através da imersão do eletrodo modificado em solução contendo o analito. Utilizando o eletrodo modificado com membrana de Nafion obteve-se uma boa sensibilidade e seletividade e um limite de detecção de 10 nmol L^{-1} de dopamina na presença de ácido ascórbico.

Do ponto de vista prático com relação aos EQMs, dois aspectos podem ser destacados: a preparação e os materiais a serem empregados como modificadores. No que se refere à preparação, os materiais modificadores podem ser imobilizados na superfície eletródica por diferentes métodos, com

destaque para a adsorção, formação de ligação covalente, recobrimento por filmes poliméricos e a utilização de materiais compósitos.

Adsorção: Método simples de fixação do agente modificador a superfície do eletrodo base conhecido como processo de quimiossorção, que consiste na deposição de uma solução ou dispersão contendo o material modificador e posterior evaporação do solvente, imobilizando-se assim o material de interesse. Outra estratégia é mergulhar o substrato na solução modificadora de interesse seguido da secagem total do solvente (*dip coating*) [43]. Eletrodos a base de carbono são mais comumente utilizados para este tipo de modificação, por apresentarem uma particular capacidade de quimissorver reagentes que possuam sistemas de elétrons π estendidos. A modificação por adsorção consiste em um método bastante simples, entretanto apresenta a desvantagem da interação entre o material modificador e o substrato não ser tão efetiva quanto em outros métodos de modificação como, por exemplo, o método por ligação covalente [44].

Ligação covalente: A modificação de superfícies por formação de ligações covalentes é realizada via ligação do agente modificador a grupos funcionais presentes na superfície do eletrodo base, podemos destacar a utilização de reagentes como aminas, organossilanos, cloreto de tionila, e cloreto cianúrico, entre outros. A modificação através da ligação covalente apresenta uma maior estabilidade frente ao método de adsorção devido aos materiais modificadores estarem mais fortemente ligados à superfície do eletrodo base [45], porém, demandam um elevado tempo de preparação da superfície.

Kim e colaboradores [46] desenvolveram um eletrodo modificado com monocamadas de um material nanohíbrido para aplicação como um biossensor para a determinação de glicerol. O material nanohíbrido consiste em camadas de nanotubos de carbono funcionalizados com tiol e camadas de nanopartículas de ouro ligadas a glicose oxidase. A modificação do eletrodo foi feita de acordo com a técnica LBL do inglês *Layer by Layer* que significa camada por camada. O eletrodo nanohíbrido com cinco monocamadas apresentou uma faixa linear de trabalho entre $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ à 10 mmol L^{-1} , uma sensibilidade de $19,27 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{ L cm}^{-2}$ e um limite de

detecção de $2,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ e um índice de recuperação entre 96% a 105% de análises em soro sanguíneo.

Materiais compósitos: Consistem na mistura de componentes, um condutor, um aglutinante e o material modificador. Geralmente emprega-se como condutor carbono em pó (grafite, negro de fumo, etc) e como aglutinante, um óleo mineral ou um material polimérico. Esses eletrodos podem apresentar consistência de pasta como, por exemplo, o eletrodo de pasta de carbono que constitui a forma mais conhecida e difundida de material compósito; ou podem ser rígidos utilizando como aglutinante materiais que apresentam uma consistência mais rígida ao contrário do aglutinante utilizado na confecção de eletrodos na forma de pasta, onde se usa geralmente óleo mineral de consistência menos rígida. A configuração final é de um material que contém o modificador em toda a sua composição. Uma vez que o modificador está distribuído por todo o substrato de modificação e não apenas em sua superfície como no método de adsorção e ligação covalente, facilita a renovação da superfície eletródica, obtendo-se também uma melhor reprodutibilidade em diferentes superfícies nessas renovações sendo que a distribuição do modificador é homogênea [47].

Shahrokhian e colaboradores [48] desenvolveram um eletrodo compósito de pasta de carbono modificado com nanotubos de carbono (MWCNT), funcionalizados com tiolina, como sensor para a determinação simultânea de ácido ascórbico (AA), acetaminofeno (AC) e isoniazida (INZ). Em condições ótimas foram obtidas curvas de calibração para o AA, AC e INZ na faixa linear de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Limites de detecção de $0,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AA; $0,05 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AC e $0,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ de INZ foram relatados.

Membranas poliméricas: Filmes poliméricos utilizados como modificadores de eletrodos, em geral, devem apresentar condutividade elétrica ou permeabilidade ao eletrólito suporte ou a espécie de interesse. Os filmes eletroativos se subdividem em duas categorias principais, dependendo de como o centro redox é imobilizado: polímeros redox, se o centro redox é parte do esqueleto polimérico; e polímeros de troca iônica se o componente redox

ativo é um contra-íon de um filme poli-iônico como polivinilpiridina ou Nafion. A utilização de membranas poliméricas apresenta vantagens referentes à sua seletividade, possuindo membranas altamente seletivas a determinados grupos de analitos. A principal vantagem é pelo fato da gama de polímeros existentes, onde a aplicação de cada um ou combinação entre diferentes polímeros pode gerar características particulares, podendo haver assim, diferentes aplicações para substâncias diferentes [49].

Gruber e colaboradores [50] desenvolveram um sensor formado por uma membrana de baixo custo seletiva a metanol, visando a determinação do álcool em cachaça (51 pirassununga). Uma membrana polimérica formada por poli (2-dodecanoilsulfanil-p-fenilenovinileno) (12COS-PPV), dopada com ácido canforsulfônico, foi imobilizada sobre a superfície de um eletrodo interdigitado. O sensor apresentou baixo custo, baixo consumo de energia, mostrou ser de fácil construção e não apresentou sensibilidade ao etanol, ácido acético e água, podendo ser utilizado em dispositivos portáteis para monitoramento do nível de metanol em bebidas alcoólicas.

Além dos procedimentos empregados para a modificação dos eletrodos, uma grande atenção é verificada para os materiais que podem ser utilizados com agentes modificadores na preparação de EQM, sendo essas espécies escolhidas de acordo com a finalidade pretendida para o dispositivo. Diversos materiais são aplicados como modificadores de eletrodos, onde os mais comumente empregados são: complexos inorgânicos, polímeros condutores, óxidos metálicos, entre outros. Recentemente, o uso de nanopartículas tem atraído um interesse significativo na construção de sensores eletroquímicos.

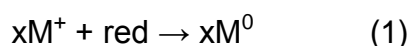
1.2.1 Nanopartículas Metálicas

Nos últimos anos, diversas áreas da ciência têm direcionado atividades na utilização de partículas nanométricas como, por exemplo, nanopartículas metálicas (NPMs). Nanopartículas metálicas possuem como principal característica seu tamanho bastante reduzido e, como consequência, novas propriedades eletrônicas, ópticas, de transporte, fotoquímicas, magnéticas, eletroquímicas e catalíticas são esperadas. Para que um material possa ser

chamado de nanomaterial, ele deve apresentar no mínimo uma dimensão em escala nanométrica e uma propriedade, como as citadas anteriormente, diferentes das observadas para o material em escala macro [51]. Assim sendo, as propriedades físicas e químicas de um nanomaterial podem diferir drasticamente daquelas observadas para o mesmo material enquanto sólido estendido (*Bulk*) [52]. Com base nisso, existe um grande potencial para aplicação desses materiais em vários campos tecnológicos [53-56]. Do ponto de vista do desenvolvimento de sensores, o uso de nanomateriais leva a um aumento do transporte de massa, devido à contribuição da difusão radial e à diminuição da razão sinal/ruído atribuída à magnitude das correntes obtidas e a sua baixa resistência interna, e sua alta área superficial efetiva [57], além de também apresentar uma alta atividade catalítica que está relacionada com o tamanho reduzido dessas nanopartículas (especialmente as partículas com diâmetro de 1-10 nm), promovendo maior interação com espécies de interesse [58].

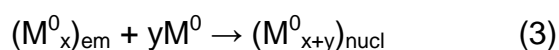
O método mais empregado para a preparação de eletrodos modificados com NPMs é o eletroquímico. A eletrodeposição baseia-se na formação de metais em escala nanométrica, através da utilização de uma solução contendo o cátion do respectivo metal. O controle do tamanho das nanopartículas é realizado através da aplicação de um potencial elétrico ou de uma corrente controlada.

O método eletroquímico de deposição apresenta dificuldades de controle de tamanho e, diante da necessidade de obtenção de NPMs com tamanhos cada vez mais reduzidos e homogeneidade na dispersão do tamanho, uma alternativa ao método de eletrodeposição é a redução química [59]. Esse método consiste na obtenção das nanopartículas a partir da redução do precursor (sal contendo o cátion do respectivo metal) utilizando um agente redutor no meio reacional. Assim, átomos do metal (M^0) são obtidos pela redução do precursor em solução, levando a formação de pequenos aglomerados chamados embriões $(M^0_x)_{em}$. Essas etapas podem ser representadas pelas equações (1) e (2).

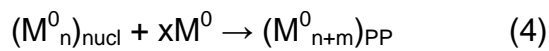




A existência de pequenos aglomerados contendo um determinado número de átomos, os quais são denominados “números mágicos”, são mais estáveis. E quando há a formação de embriões de tamanhos intermediários, esses tendem a dissociar ou crescer, no intuito de se tornarem estáveis. A adição e respectiva redução de mais cátions metálicos no sistema reacional faz com que haja a formação de núcleos $(M^0_n)_{nucl}$ a partir dos embriões, formando, assim, partículas sólidas de tamanhos críticos (equação 3).



A incorporação de mais átomos do metal reduzido aos núcleos promove a formação de partículas de tamanho nanométrico do respectivo metal, o que pode ser representado pela equação 4.



Além da aglomeração, pode ocorrer no meio reacional a formação de partículas maiores $(M^0)_p$, deixando, assim, de ser nanopartículas [60]. Nesse aspecto, há a necessidade de impedir o crescimento das nanopartículas quando apresentam o tamanho crítico desejado. Para a estabilização das nanopartículas, geralmente são incorporadas espécies na superfície do nanomaterial, onde além de transmitir estabilidade ao sistema, podem também apresentar características de funcionalização da superfície das nanopartículas. Um exemplo é a utilização de espécies orgânicas contendo grupos tióis para a estabilização de nanopartículas de ouro e prata, devido à afinidade desses metais com o enxofre do grupo tiol. Outras moléculas orgânicas (alifáticas e aromáticas) também são bastante empregadas na passivação de nanopartículas de metais nobres; essas moléculas apresentam grande variedade de grupos funcionais, como o ciano (-CN), mercapto (-SH), ácido carboxílico (-COOH) e amino (-NH₂).

Para a estabilização de NPMs dispersas, as moléculas empregadas como passivantes devem apresentar energia repulsiva suficiente para compensar as forças de atração (van der Waals) entre as nanopartículas. Para tal, dois métodos são frequentemente utilizados: (1) desenvolvimento de carga na superfície das NPMs, onde a repulsão dá-se de forma eletrostática; e (2) incorporação de moléculas orgânicas na superfície das NPMs, que impedem a aglomeração através do impedimento estérico. Os dois métodos podem ser observados na Figura 3A e 3B, respectivamente.

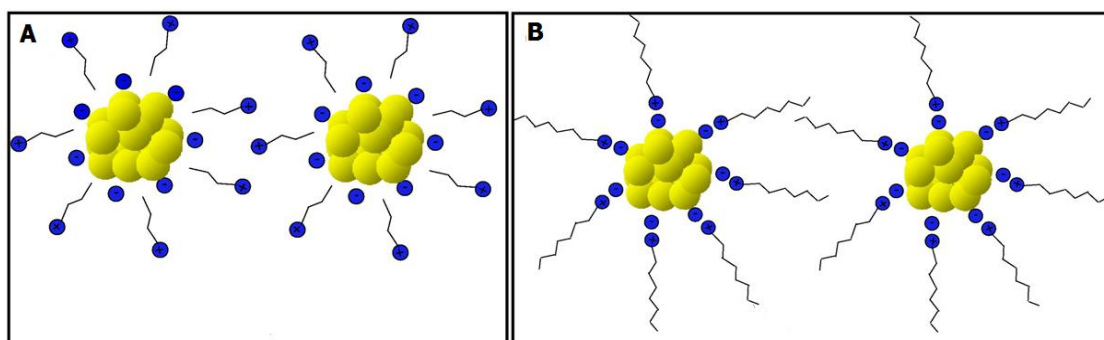


Figura 3 - Representação esquemática do processo de passivação através da: A) repulsão eletrostática; B) Impedimento estérico. [61]

A partir da passivação das NPMs no meio reacional, tem-se a estabilização das mesmas. Essa passivação ocorre de maneira rápida, à medida que o precursor é reduzido, formando nanopartículas de dimensões bastante reduzidas e com boa homogeneidade de tamanho.

O tamanho reduzido das NPMs influencia diretamente na resposta eletroquímica, uma vez que há um aumento no transporte de massa, quando há o emprego de partículas em escala nanométrica. O regime de transporte de massa muda em função da densidade de nanopartículas presentes na superfície eletródica. Quando a densidade é baixa e as nanopartículas estão mais espaçadas umas das outras, cada nanopartícula atua como se fosse um microeletrodo, o que significa que a chegada do analito ou eletrólito à superfície das NPMs acontece em todas as direções, de forma radial, aumentando assim, o transporte de massa e consequentemente o aumento da corrente. Quando a densidade de nanopartículas na superfície é maior, aumenta também a aproximação entre uma nanopartícula (NP) e outra, o que faz com que haja uma sobreposição entre as camadas de difusão das espécies na superfície das

NPs, tendendo, assim, para um regime de difusão planar. A Figura 4 mostra o esquema da influência da distância entre as nanopartículas sobre o transporte de massa.

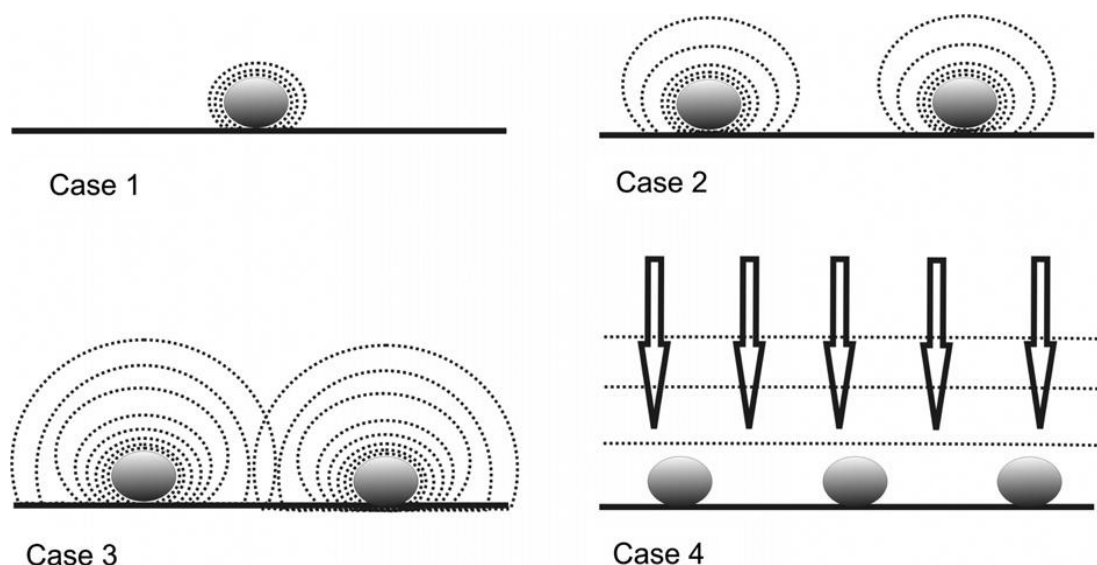


Figura 4 - Esquema de um conjunto de difusão de NPs, Caso1: difusão radial de uma única partícula isolada, com difusão radial menor do que o raio da NP; Caso 2: Difusão convergente entre duas nanopartículas adjacentes, porém com difusão radial independente; Caso 3: Difusão parcialmente sobrepostas entre duas NPs adjacentes mais próximas em comparação ao Caso 2; Caso 4: Forte sobreposição das camadas de difusão levando a uma difusão linear da matriz como um todo. [62]

A mudança da disposição das NPs e, conseqüentemente, do regime de difusão das espécies reflete diretamente no perfil voltamétrico obtido para eletrodos modificados. Compton e colaboradores [62] desenvolveram um trabalho realizando uma comparação com eletrodo de carbono pirolítico modificado com nanopartículas de prata (NPAg) com 0,3%, 3,5% e 10,2%, obtendo voltamogramas para a redução de Cr^{3+} . Os perfis dos voltamogramas obtidos podem ser observados na Figura 5.

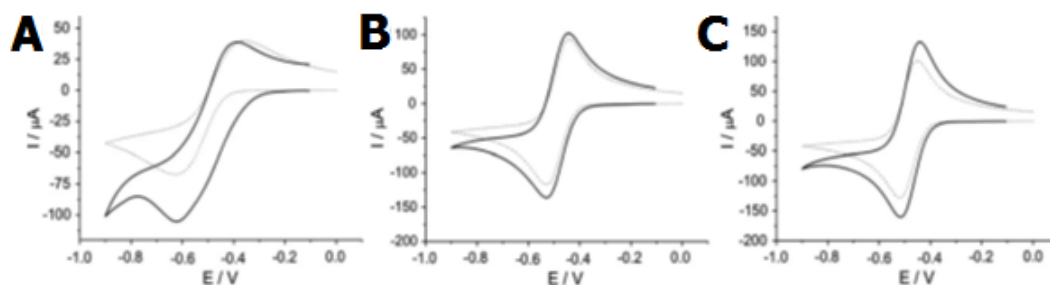


Figura 5 - Perfis voltamétrico para o eletrodo modificado com NPAg, A) 0,3%, B) 3,5%, e C) 10,2%. [62]

Os voltamogramas obtidos mostraram que há uma relação direta entre a porcentagem de nanopartículas e o perfil voltamétrico. A Figura 5A apresenta uma resposta sigmoideal, devido à melhora do transporte de massa, o que mostra que a reposição das espécies a serem oxidadas ou reduzidas é mais eficiente na superfície das NPAg e promovendo, assim, um maior incremento de corrente. Quando existe uma porcentagem maior de NPAg na superfície do eletrodo, a proximidade entre elas faz com que haja uma sobreposição na camada de difusão e um maior efeito sobre o processo de difusão total, o que promove um comportamento global semelhante aos observados em eletrodos planares convencionais, apresentando um perfil voltamétrico com picos mais definidos, como pode ser observado nas Figuras 5B e 5C. A definição dos processos redox dá-se pelo fato de haver uma menor reposição de espécies ativas na superfície eletródica similar à de um eletrodo planar. Assim, além da importância do tamanho das NPs, é fundamental o conhecimento de como elas estão dispersas sobre a superfície do eletrodo.

Há um grande número de trabalhos utilizando nanopartículas metálicas como modificadores eletroquímicos, com destaque para as nanopartículas de ouro [63] e platina [64]. Martínez e colaboradores [65] realizaram a determinação de crômio (VI) utilizando eletrodos impressos modificados com nanopartículas de prata (NPAg) e nanopartículas de ouro (NPAu). A síntese das nanopartículas foi realizada através da deposição eletroquímica, aplicando um potencial fixo de -0,80 V durante um tempo de 400s para as NPAg e um potencial de 0,18 V durante um tempo de 200 s para a obtenção das NPAu. A determinação de crômio empregando um procedimento de redissolução anódica por voltametria de pulso diferencial também foi avaliada, sendo relatados limites de detecção de $8,5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e $4,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, para as NPAg e NPAu, respectivamente.

Omidfar e colaboradores [66] desenvolveram um imunossensor para a determinação de albumina em urina, utilizando um eletrodo impresso modificado com nanopartículas de ouro (NPAu) e álcool polivinílico (PVA). A obtenção das NPAu foi feita através da síntese química pela redução do ácido tetraclore áurico (HAuCl_4). Para a construção do imunossensor, albumina e PVA foram incorporados na superfície das NPAu. O eletrodo impresso

modificado foi aplicado na determinação de albumina em soro humano, obtendo uma faixa linear de trabalho de $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ à $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ e um limite de detecção de 25 ng mL^{-1} .

Shen e colaboradores [67] desenvolveram um sensor para glicose, empregando um eletrodo impresso modificado com nanopartículas de platina (NPt), obtidas pelo processo sol-gel. A obtenção dessas NPt foi realizada através do precursor ácido hexacloro platínico (H_2PtCl_6), onde a platina foi reduzida quimicamente pelo boriidreto de sódio (NaBH_4). Para a preparação do biossensor, foram incorporados nas NPt, nanotubos de carbono (CNT) e a enzima glicose oxidase (GOx). A determinação de glicose empregando o biossensor modificado com NPt, CNT e GOx apresentou uma faixa linear de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ à 25 mmol L^{-1} e uma sensibilidade de $0,98 \mu\text{A L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-2}$.

Tamiya e colaboradores [68] desenvolveram um eletrodo modificado com nanopartículas de platina (NPt) e de ouro (NPAu) empregando como substrato de modificação eletrodos impressos (EI). A modificação da superfície do EI foi realizada por um processo de eletrodeposição com um potencial constante de $-0,4 \text{ V}$, durante diferentes períodos de tempo, em solução contendo os sais precursores dos metais ($\text{AuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e PtCl_2). Após a obtenção das NP sobre a superfície dos EI, os eletrodos EI-NPt e EI-NPAu foram caracterizados com relação as suas morfologias e composições químicas superficiais. As NPs metálicas depositadas apresentaram boa atividade catalítica na evolução de hidrogênio a partir de H_2O_2 , sendo o eletrodo EI-NPt empregado como sensor para a determinação de H_2O_2 com um limite de detecção de $16 \mu\text{mol L}^{-1}$.

O uso de nanopartículas de prata na preparação de eletrodos quimicamente modificados vem crescendo acentuadamente. A prata consiste em um material quatro vezes mais barato que o ouro, apresenta boa atividade catalítica [69], boa condutividade elétrica e térmica, favorecendo assim, sua ampla aplicação na área de eletroanálises [59].

Renedo e Martinez [70] investigaram a determinação voltamétrica de antimônio, utilizando um eletrodo impresso de carbono modificado com nanopartículas de prata, empregando um procedimento de redissolução anódica. O eletrodo foi modificado pela eletrodeposição das nanopartículas a

partir de uma solução contendo AgClO. Diversos parâmetros da preparação foram estudados e controlando o potencial de deposição em -0,80 V (vs. Ag/AgCl), por 400s, nanopartículas de 50 nm foram obtidas. O método apresentou um limite de detecção de $6,79 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ e foi aplicado na determinação de antimônio em água do mar.

Sun e colaboradores [71] construíram um sensor para a determinação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) empregando um eletrodo impresso modificado com nanopartículas de prata decoradas com polipirrol. Para a modificação, o EI permaneceu em contato durante uma noite com uma dispersão de pirrol e H_2O_2 para sua polimerização. Posteriormente, adicionou-se a essa dispersão AgNO_3 , seguido de aquecimento, obtendo-se assim a dispersão de NPAg decoradas com polipirrol. O EI modificado foi caracterizado e utilizado na determinação amperométrica de H_2O_2 , obtendo uma faixa linear de trabalho de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ a 90 mmol L^{-1} e um limite de detecção de $1,05 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Compton e colaboradores [72] realizaram a determinação de H_2O_2 utilizando um eletrodo modificado com nanopartículas de prata eletrodepositada. A modificação foi realizada sobre a superfície de eletrodos de carbono, pirolítico (ECP) e vítreo (ECV), aplicando um potencial fixo durante um determinado tempo. Os eletrodos modificados com as nanopartículas de prata apresentaram potencialidade para a determinação de H_2O_2 , sendo observada uma sensibilidade cinco vezes maior para o eletrodo modificado, em comparação ao macro eletrodo de prata, e um limite de detecção de $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Cabe sumarizar que a maior parte dos trabalhos relatados utilizando nanopartículas de prata na preparação de EQM emprega procedimentos eletroquímicos para a obtenção das NP, o que, em geral, não apresentam boa homogeneidade na distribuição do tamanho médio. A rota química para a obtenção de NP permite a obtenção de partículas com tamanhos bem reduzidos e uma baixa dispersão no diâmetro médio. Além disso, outra possibilidade apresentada por essas nanopartículas consiste no uso desse material para suportar em sua superfície agentes modificadores. Estes podem

atuar para pré-concentrar espécies de interesse e/ou mediar reações redox como, por exemplo, hexacianoferratos metálicos.

1.2.2 Hexacianoferratos Metálicos

Hexacianoferratos metálicos (MHCF) consistem em uma classe de materiais inorgânicos polinucleares que, do um ponto de vista funcional, se assemelham a polímeros condutores π -conjugados, a zeólitas, e polímeros condutores redox. São muito utilizados na recuperação de cério, a partir de resíduos radioativos, e de prata e paládio em soluções diluídas. Essa recuperação se dá pela pré-concentração desses elementos, provavelmente pela complexação desses metais com os MHCF [73].

Os MHCF insolúveis constituem uma importante subclasse de modificadores empregados na preparação de EQM, sendo o Azul da Prússia ou hexacianoferrato de ferro (FeHCF) a espécie mais utilizada. Recentemente, hexacianoferratos metálicos têm sido aplicados em diversas tecnologias, incluindo armazenamento de carga, proteção contra corrosão, eletrocatalise, dispositivos eletrocromáticos e desenvolvimento de sensores [74].

O Azul da Prússia tem uma estrutura cúbica de face centrada com alternância de ferro (II) e (III), onde os íons ferro (III) são cercados octaetricamente por átomos de nitrogênio e os íons ferro (II) são rodeados por átomos de carbono ($\text{Fe}^{2+}\text{-CN-Fe}^{3+}$). A estrutura do Azul da Prússia está mostrada na Figura 6 [75, 76].

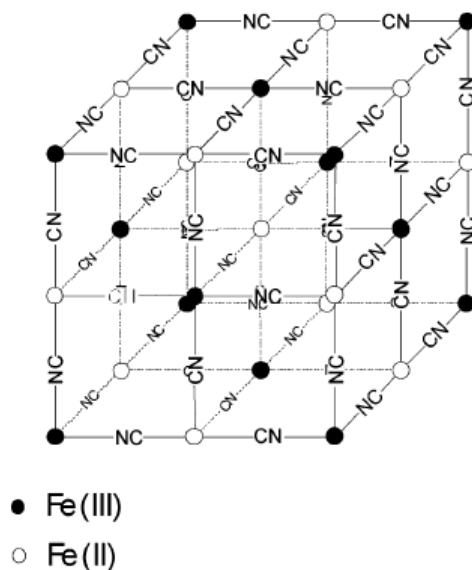


Figura 6 - Estrutura proposta para o Azul da Prússia. [75, 76]

A forma mais comum de obtenção do Azul da Prússia é obtida através do método clássico da mistura de sais de ferro e íons hexacianoferrato ($\text{Fe}^{3+}[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]_4$ ou $\text{Fe}^{2+}[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]_3$). Nesse processo, existe a formação imediata de um colóide azul escuro. Em contrapartida, soluções contendo íons férricos e hexacianoferratos (III) são aparentemente estáveis.

A síntese dos MHCF pode ser realizada através de troca iônica de um sólido já existente. Isso ocorre devido à capacidade de remoção de cátions metálicos por outros de maior afinidade. Um exemplo é a utilização de hexacianoferrato de cobre na remoção de cátions alcalinos. A capacidade de remover cátions decresce na seguinte ordem: $\text{Na}^+ > \text{H}^+$, $\text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Tl}^+ > \text{Cs}^+$.

Outro método bastante difundido na obtenção de MHCF consiste no uso de procedimentos eletroquímicos. Duas formas são mais comuns, eletrodeposição realizada em solução já contendo o MHCF, incorporando o modificador na superfície do eletrodo, geralmente inerte. A segunda forma de modificação consiste na eletrodeposição do MHCF, a partir de uma solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, sobre a superfície do metal de interesse. Por exemplo, a incorporação de CuHCF sobre a superfície de um eletrodo de cobre.

O método de obtenção de MHCF por eletrodeposição consiste na deposição de hexacianoferrato na superfície de um eletrodo polarizado. Esse processo pode ocorrer de diferentes formas, através da aplicação de um potencial constante durante um determinado tempo (método potencioestático);

por meio do método potenciodinâmico, que consiste na realização de varreduras cíclicas de potencial; e no método galvanostático, baseado na aplicação de uma corrente constante durante um determinado tempo.

A estrutura para os análogos do Azul da Prússia é muito semelhante, apresentando íons $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]^-$ / $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]^{4-}$ ligados ao respectivo metal pelo nitrogênio ($\text{Fe}^{2+}\text{-CN-M}^{\text{X}+}$). Como exemplo pode-se citar o hexacianoferrato de prata, $\text{Fe}^{2+}\text{-CN-Ag}^+$, cuja estrutura está ilustrada na Figura 7.

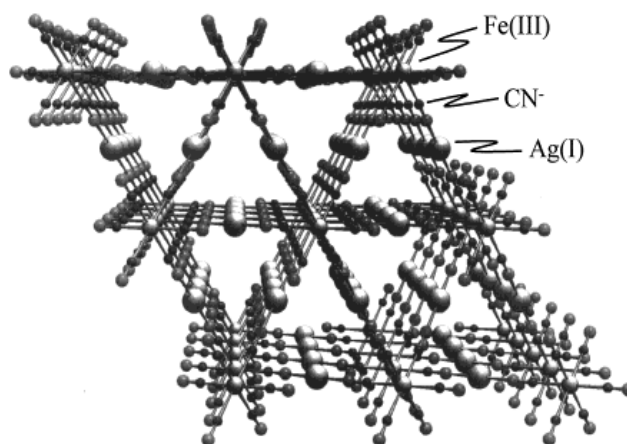
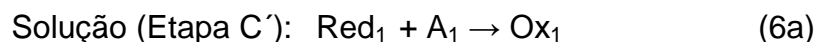
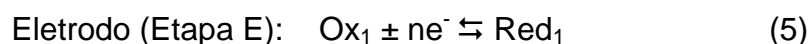


Figura 7 - Estrutura proposta para o AgHCF [77].

A estrutura do AgHCF mostrada na Figura 7 apresenta interstícios em seu interior, os quais estão ocupados por íons monovalentes, geralmente K^+ ou Ag^+ . Durante os processos redox desse sistema existe a intercalação/extração desses cátions da estrutura, simultânea à transferência eletrônica. Tal fenômeno é fundamental para manter a neutralidade de carga durante os processos redox [73, 76, 78] e relatado para diversos outros análogos do Azul da Prússia.

Trabalhos explorando características eletroquímicas semelhantes as do Azul da Prússia, utilizando AgHCF como modificadores na preparação de EQM, também são relatados [74, 76]. A aplicação de análogos MHCF como mediadores de reações redox está fundamentada na existência de reações químicas acopladas, formando um mecanismo do tipo eletroquímico - químico catalítico (EC'). O processo EC' faz parte de um conjunto de reações que

acontecem próximas a superfície eletródica e intercolocadas à transferência eletrônica, sendo chamadas em geral de reações químicas acopladas. O mecanismo EC' pode ser representado pelas equações (5) e (6a e 6b). No eletrodo ocorre a etapa eletroquímica (E) e na solução adjacente a ele, a etapa química (C'):



Onde A_1 e A_2 representam analitos que podem ser reduzidos ou oxidados, respectivamente.

As reações químicas acopladas (equações 6a e 6b) regeneram o reagente da reação de eletrodo (equação 5) e estando o eletrodo polarizado adequadamente, o ciclo gerará um ganho de corrente anódica ou catódica [79]. A Figura 8 mostra a representação esquemática de um processo EC' para uma oxidação mediada pelo AgHCF.

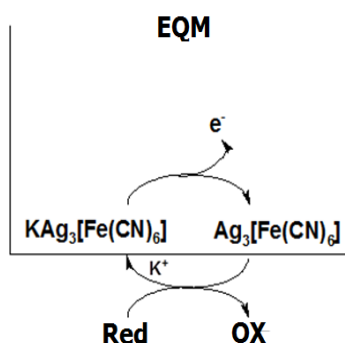


Figura 8 - Possível mecanismo EC' proposto para uma reação de oxidação utilizando o AgHCF.

No esquema apresentado na Figura 8, um potencial suficientemente positivo é aplicado no eletrodo, oxidando o AgHCF. A forma oxidada reage quimicamente com a espécie de interesse na solução, voltando a sua forma reduzida. Entretanto, como o potencial aplicado ao eletrodo ainda é suficientemente positivo, promove novamente a oxidação do AgHCF contido na superfície do eletrodo. Assim, a reoxidação do AgHCF causa um aumento da

corrente anódica em comparação ao mesmo processo de oxidação na ausência do processo EC', ou seja, do analito. Sendo assim, devido à presença de reações químicas acopladas, muitos trabalhos são encontrados na literatura empregando MHCF como modificador de eletrodos.

Taheri e colaboradores [80] desenvolveram um trabalho realizando a determinação simultânea de dopamina (DA), ácido ascórbico (AA) e ácido úrico (UA), utilizando um eletrodo modificado com nanotubos de carbono (CNTs) decorados com nanopartículas de hexacianoferrato de prata (AgHCF-NPs). As nanopartículas de hexacianoferrato de prata foram preparadas através da mistura de uma solução de nitrato de prata (AgNO_3) com ferricianeto de potássio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) em banho de ultrassom na presença de CNT. Através da utilização do eletrodo modificado como sensor para DA, AA e UA, foi obtida uma faixa linear de trabalho de $4,0 \times 10^{-6}$ a $7,8 \times 10^{-5}$; $2,4 \times 10^{-6}$ a $1,3 \times 10^{-4}$ e $2,0 \times 10^{-6}$ a $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; e limites de detecção de $4,2 \times 10^{-7}$, $1,4 \times 10^{-7}$ e $6,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.

Shen e colaboradores [81] desenvolveram um sensor amperométrico para a determinação de colesterol e peróxido de hidrogênio, empregando como modificador nanopartículas de hexacianoferrato de níquel (NiHCF). A síntese do NiHCF foi feita através da reação química entre o cloreto de níquel (NiCl_2) e o hexacianoferrato de potássio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), misturando soluções dos dois precursores. Após a obtenção das nanopartículas, a dispersão foi misturada com nanotubos de carbono (CNT) e posteriormente misturada a colesterol oxidase e peroxidase, obtendo assim um biossensor preparado sobre um eletrodo de carbono vítreo (ECV). Os eletrodos modificados foram caracterizados e posteriormente aplicados para a determinação de H_2O_2 e colesterol. Os resultados demonstraram grande potencialidade do método, com uma faixa linear de trabalho para o colesterol de $0,005 \text{ mmol L}^{-1}$ a 3 mmol L^{-1} .

Zheng e colaboradores [82] desenvolveram um sensor para a determinação de glicose, empregando um eletrodo modificado com nanopartículas de hexacianoferrato de túlio (NPTmHCF). As nanopartículas foram obtidas através da reação química entre $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ e cloreto de túlio hexaidratado ($\text{TmCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), onde após a obtenção da dispersão de NPTmHCF, as nanopartículas foram misturadas a glicose oxidase e

incorporadas em quitosana. O modificador obtido foi depositado sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo (ECV), obtendo-se assim o eletrodo modificado, que foi aplicado na determinação de glicose através da técnica de voltametria de onda quadrada. O eletrodo modificado apresentou grande potencialidade como sensor para a determinação de glicose, exibindo um limite de detecção de $6 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Fenga e colaboradores [83] relataram o uso de um eletrodo compósito preparado com pó de grafite, resina epóxi e nanopartículas comerciais de prata, para a determinação de procaína e sulfamerazina. Hexacianoferrato de prata foi preparado sobre as nanopartículas empregando um procedimento potencioestático a $1,0 \text{ V}$ (Ag/AgCl). O dispositivo foi morfológicamente caracterizado e em uma solução contendo os analitos houve um decréscimo nos sinais redox do hexacianoferrato, atribuído a precipitação dos fármacos sobre a superfície eletródica. Usando a diminuição do pico catódico foi relatado um intervalo de resposta linear de $1,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, para ambos os analitos.

Essa gama de sensores desenvolvidos utilizando MHCF pode ser empregada de forma tradicional ou incorporada a sistemas de automação, como por exemplo, em detectores amperométricos utilizados em sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA).

1.3 Análise por Injeção em Fluxo

Em geral, a maioria das análises químicas convencionais envolve uma série de etapas como, por exemplo, dissolução, pré-concentração, adição de reagentes, mistura, entre outras. Em um procedimento analítico tradicional cada etapa normalmente demanda tempo e cuidado especial do operador. Essas operações podem ser críticas no que se refere a consumo de tempo e à precisão das medidas, pois exigem a intervenção constante do analista durante as operações. Essas limitações tornam-se mais pronunciadas à medida que um número maior de análises é exigido. Uma opção para melhorar o desempenho é a utilização de um sistema de automação para procedimentos

analíticos [84]. Dentro deste contexto, os sistemas de análises por injeção em fluxo ou sistemas FIA (Flow Injection Analysis), propostos em meados da década de 70, se mostram como uma maneira eficiente de superar problemas dessa natureza, uma vez que todas as etapas envolvidas no procedimento são realizadas em um sistema fechado.

Sistemas FIA se baseiam na injeção de uma alíquota da solução da amostra em um fluxo não segmentado de uma solução transportadora. A amostra sofre um processo de dispersão ao ser conduzida através do percurso analítico até o detector [85]. Além da dispersão, diversas outras operações podem ser promovidas durante o percurso, como por exemplo, adição de reagentes, diluição, mistura, entre outras. Parâmetros como volume injetado da amostra, vazões do fluido transportador e dos reagentes podem ser controlados de forma a otimizar as condições desejadas [84].

A configuração convencional do sistema FIA pode ser resumida em quatro unidades básicas: sistema de propulsão, sistema de injeção da amostra, reator ou percurso analítico e detector. A estrutura básica do sistema FIA pode ser observada na Figura 9.

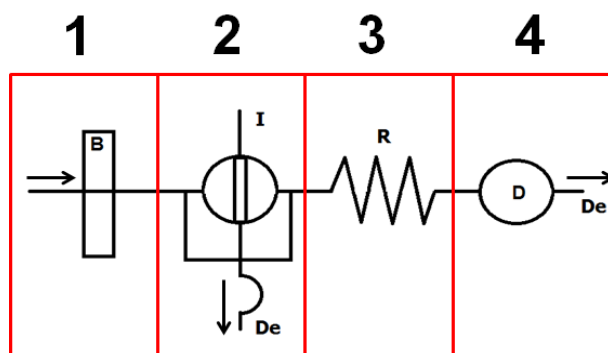


Figura 9 - Configuração geral de um sistema em fluxo. 1- sistema de propulsão, 2- sistema de injeção, 3- reator-R, 4- sistema de detecção, De- descarte de amostra e reagentes.

O sistema de propulsão geralmente consiste em uma bomba peristáltica com torque suficiente para manter uma vazão constante, mesmo que ocorram variações na impedância hidrodinâmica do sistema, ou seja, variações quanto à dificuldade da passagem da solução transportadora. Outros sistemas podem ser também empregados como um sistema de propulsão, como por exemplo, bomba por pistão, através de pressão por gases e também o emprego de

propulsão por gravidade. A função do sistema de propulsão é movimentar constantemente e uniformemente os reagentes, amostra e solução carregadora [86].

O sistema de injeção da amostra consiste em um dispositivo que serve para introduzir um volume discreto e reprodutível de uma amostra em um fluxo de reagentes ou de uma solução carregadora adequada. Diversos dispositivos são empregados como injetores de amostras, como seringas e válvulas, sendo a válvula rotatória a mais comumente empregada. O reator, ou percurso analítico, consiste no caminho em que amostra percorre do ponto de injeção até o detector; nesse percurso a amostra pode sofrer diversos processos. O dimensionamento do mesmo deve levar em conta o tempo de residência da amostra e as vazões das soluções carregadoras e dos reagentes. Sendo assim, o aumento do percurso ocasionará uma diminuição do sinal analítico, devido à ocorrência do processo de dispersão.

O detector consiste na unidade onde é realizada a leitura do sinal referente ao analito presente na amostra injetada. Diferentes detectores podem ser empregados, destacando-se os espectrofotométricos e eletroquímicos.

A análise por injeção em fluxo teve grande avanço com pesquisas desenvolvidas no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da USP, localizado em Piracicaba (SP), após a chegada de Jaromir Ruzicka, pesquisador que propôs o sistema em fluxo contínuo [86]. A técnica se destaca não só pela sua simplicidade e facilidade de manuseio, mas também pela versatilidade, uma vez que podem ser acoplados ao sistema diferentes detectores como, por exemplo, detectores espectrofotométricos, condutométricos, fluorimétricos, potenciométricos, amperométricos, entre outros, o que propicia a técnica uma ampla gama de aplicações [87].

Dos detectores eletroquímicos empregados em sistemas FIA, os amperométricos são mais frequentemente utilizados. Uma vez que as condições de dispersão da amostra, tempo para o desenvolvimento das reações químicas e outros parâmetros das reações como pH, quantidade da amostra, temperatura, etc., são rigorosamente controlados, e a técnica apresenta excelente precisão e repetibilidade dos sinais. O sistema também se destaca pelo baixo tempo de análise, devido ao fato de não necessitar que as

reações químicas atinjam o equilíbrio químico, pois o tempo disponível para o desenvolvimento das reações é mantido rigorosamente para todas as amostras e padrões [85].

O crescente interesse no número de trabalhos relacionados com detectores eletroquímicos aplicados em FIA utilizando EQM pode ser atribuído à versatilidade dos sensores potenciométricos e amperométricos. Existe a possibilidade de utilizar eletrodos modificados com diferentes materiais, para analitos diversos, tais como: metais, pesticidas, fármacos e outros. Em geral, esses dispositivos são de baixo custo quando comparados a outros tipos de detectores, como, por exemplo, aqueles baseados em absorção e emissão atômica. Em relação aos detectores UV-vis, destaque para a minimização ou eliminação de reagentes auxiliares, pois, na grande maioria dos casos, os analitos são diretamente detectáveis em sistemas eletroquímicos, não necessitando de reação prévia.

Zagatto e colaboradores [88] realizaram a determinação potenciométrica de cádmio em amostras de águas residuais usando um sistema FIA. Foi utilizada uma minicoluna (2 cm de altura e 1,85 cm de diâmetro) contendo uma resina de troca aniônica fortemente básica, para reter o cádmio na forma de um cloro-complexo. A determinação potenciométrica do metal foi realizada utilizando um eletrodo tubular contendo uma dupla membrana cristalina de cádmio. As análises foram realizadas em uma faixa linear de $0,056 \text{ mg L}^{-1}$ a $56,2 \text{ mg L}^{-1}$, com desvio padrão menor que 1,5 %, além de um limite de detecção de $0,011 \text{ mg L}^{-1}$.

Paixão e colaboradores [89] desenvolveram um método para a determinação de glicerol através da análise amperométrica, empregando um sistema FIA. Para tal, utilizaram um eletrodo de cobre para promover a oxidação do glicerol. A curva de calibração apresentou uma faixa linear de 3 mg L^{-1} a 160 mg L^{-1} e um limite de detecção e quantificação de $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,85 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente.

Através dos exemplos relatados na literatura, é possível verificar que sistemas FIA oferecem ganho na sensibilidade, repetibilidade e velocidade de amostragem. Assim, é comum o emprego desses sistemas na análise de

controle de qualidade ou análises clínicas de diversos analitos, tais como fármacos, como é o caso da isoniazida.

1.4 Isoniazida (INZ)

O ácido 4-piridino carboxílico hidrazina, ou isoniazida (Figura 10), apresenta a fórmula molecular $C_6H_7N_3O$, e massa molar $137,139 \text{ g mol}^{-1}$. Apresenta-se como um pó cristalino branco, com alta solubilidade em água, baixa solubilidade em etanol e praticamente insolúvel em éter e benzeno. Possui valores de pKa de 2,0 e 3,5 [90]. A INZ consiste em uma droga importante utilizada na prática clínica como agente antituberculástico, proporcionando um eficaz tratamento contra cepas de micobactérias e é classificada como de primeira classe, ou seja, é altamente eficaz, administrada via oral, apresenta alta tolerância e toxicidade mínima [91]. Com relação à forma de atuação, vários mecanismos têm sido propostos, onde os mais aceitos são que a isoniazida tem ação bacteriostática ou ação bactericida para interferir no metabolismo de proteínas bacterianas, ácidos nucleicos, carboidratos e lipídios [92-94].

O fármaco apresenta-se em concentrações plasmáticas na faixa de $2,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ a $3,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ [95]; essas concentrações são atingidas duas horas após sua ingestão, estando a INZ difundida em vários líquidos e tecidos do corpo humano. Cerca de 75% da quantidade ingerida (dose oral) de INZ são excretadas na urina em 24 horas, sendo que metade dessa quantidade se encontra na forma inalterada, ou seja, não metabolizada [95].

O uso inadequado de INZ pode causar hepato toxicidade em pacientes, verificada em uma resposta inflamatória. Estudos demonstram que a longo prazo a terapia com isoniazida pode desencadear lúpus eritematoso sistêmico e também a ocorrência de acidentes de intoxicação e até mesmo morte, ocasionalmente devido à superdosagem [92, 93]. Sendo assim, a quantificação da INZ e o controle de sua dose são muito importantes na química clínica, o que torna necessário desenvolver métodos rápidos e eficazes para a detecção

desse composto, tanto em formulações farmacêuticas, quanto em fluidos biológicos.

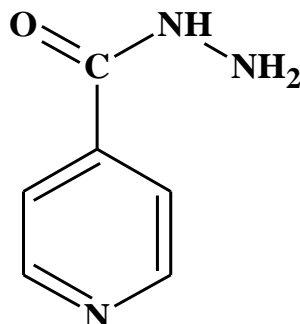


Figura 10 - Estrutura molecular da isoniazida (INZ).

Vários métodos analíticos são empregados na determinação de INZ, merecendo destaque os métodos espectroscópicos e de separação como, por exemplo, métodos cromatográficos e eletroforéticos [96]. Existem poucos relatos descrevendo a aplicação de técnicas eletroanalíticas na determinação de INZ [97].

Shahrokhian e Asadian [97] desenvolveram um eletrodo a base de pasta de carbono (EPC) aplicado como sensor para a determinação de ácido ascórbico (AA) e acetaminofeno (AC) na presença de INZ. O EPC foi modificado com tionina imobilizada em nanotubos de carbono (CNT), através da mistura e homogeneização dos componentes da pasta, grafite (60%), nujol (25%) e modificador (15%). A determinação simultânea dos analitos foi realizada através das técnicas de voltametria cíclica e de pulso diferencial. A distinção das espécies, através da separação dos picos referentes a cada analito, foi possível para uma faixa linear de trabalho de $1,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para o AA, $1,0 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para o AC e $1,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para a INZ.

Yang e colaboradores [98] desenvolveram um sensor para a determinação de isoniazida utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com ácido amidosulfônico. A modificação do eletrodo foi realizada através da eletrodeposição do ácido na superfície do eletrodo e a determinação foi feita usando voltametria de redissolução anódica por pulso diferencial. A curva

analítica apresentou uma faixa de resposta linear de $5,0 \times 10^{-8}$ a $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e um limite de detecção de $1,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹.

Guo e colaboradores [99] desenvolveram um trabalho realizando a determinação amperométrica de INZ utilizando um eletrodo modificado com carbono mesoporoso (MC) e Nafion. Para a modificação, foi preparada uma suspensão de carbono mesoporoso com Nafion, misturando 2 mg de MC, 0,1 mL de Nafion e 0,9 mL de água deionizada; a dispersão foi colocada em banho de ultrassom para homogeneização e em seguida foi depositada sobre a superfície de um eletrodo de carbono vítreo. Usando o eletrodo modificado, obteve-se um limite de detecção de $8,4 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ e uma faixa linear de $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ a $3,7 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de INZ.

Recentemente, um trabalho relatado na literatura apresentou a determinação de isoniazida utilizando eletrodos impressos. Neste trabalho, Bergamini e colaboradores [94] desenvolveram um sensor para a determinação de INZ empregando eletrodo impresso modificado com poli-histidina. A modificação foi realizada pela incorporação da poli-histidina pelo processo de eletropolimerização. O eletrodo foi aplicado na determinação de INZ em urina sintética, através das técnicas de voltametria linear, de pulso diferencial e de onda quadrada, sendo relatados limites de detecção de $5,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, $1,7 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e $2,5 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, respectivamente.

Apesar dos eletrodos impressos consistirem de dispositivos que oferecem diversas vantagens, como simplicidade e baixo custo, ainda foram pouco explorados para a determinação de isoniazida, em sistemas em fluxo. Assim, neste trabalho utilizaram-se eletrodos impressos modificados com AgHCF, depositados sobre nanopartículas de prata sintetizadas a partir do método bifásico, para a determinação amperométrica de INZ, usando um sistema FIA.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Construir e avaliar um eletrodo impresso de carbono, modificado com hexacianoferrato de prata depositado sobre nanopartículas de prata sintetizadas pelo método bifásico, como detector amperométrico para a determinação de Isoniazida (INZ), empregando um sistema de análise por injeção em fluxo (FIA).

2.2 Etapas propostas

- i) Sintetizar nanopartículas de prata e caracterizar o material preparado;
- ii) Modificar eletrodos com NPAg e caracterizar o comportamento voltamétrico destas em meio básico. Comparar o perfil de resposta com eletrodos convencionais de prata;
- iii) Preparar hexacianoferrato de prata (AgHCF) sobre os eletrodos contendo NPAg, através de método galvanostático, e verificar a influência das condições experimentais;
- iv) Investigar a potencialidade dos eletrodos construídos, como sensores eletroquímicos, na determinação de INZ;
- v) Desenvolver um método para determinação de INZ, empregando o dispositivo proposto como detector amperométrico em um sistema FIA;
- vi) Verificar a influência de possíveis interferentes na resposta amperométrica do detector;
- vii) Aplicar a procedimento proposto para a determinação do analito em amostra de urina sintética enriquecida com INZ.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes

Durante a execução do projeto, materiais foram sintetizados e soluções preparadas. Os reagentes utilizados nos experimentos foram empregados sem prévia purificação e estão especificados na TABELA 1. As soluções foram sempre preparadas em água deionizada.

TABELA 1 - ESPECIFICAÇÃO DOS REAGENTES UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS.

| Reagente | Marca | Pureza |
|---|--------------|--------|
| AgNO ₃ | Merck | 99,8% |
| NaBH ₄ | Merck | 99,3% |
| N(C ₈ H ₁₇) ₄ | Merck | 99% |
| Dodecanotiol | Merck | 99,5% |
| Etanol | Vetec | PA |
| Tolueno | Merck | PA |
| H ₂ SO ₄ | Merck | PA |
| NaOH | Mallinckrodt | PA |
| KNO ₃ | Reagen | PA |
| K ₃ [Fe(CN) ₆] | Ecibra | PA |
| KCl | Fluka | 99,5% |
| CaCl ₂ | Vetec | 99,2% |
| NH ₄ Cl | Merck | 99,1% |
| KH ₂ PO ₄ | Merck | 98,9% |
| Na ₂ SO ₄ | Fluka | 99,4% |

| | | |
|-----------------|---------|-----|
| Glicose | Becto | PA |
| Ácido ascórbico | Aldrich | 99% |
| Dopamina | Aldrich | 98% |
| Rifampicina | Aldrich | 97% |
| Isoniazida | Aldrich | 99% |

3.2 Procedimento experimental

3.2.1 Síntese das nanopartículas de prata

A obtenção das nanopartículas de prata utilizadas neste projeto foi feita através da rota química em um sistema bifásico descrito por Oliveira e colaboradores [100]. A Figura 11 é uma representação esquemática da síntese empregada na obtenção das NPAg.

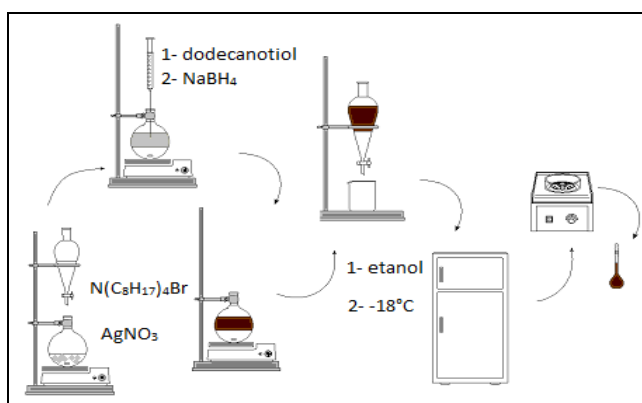


Figura 11 - Representação esquemática da síntese das NPAg.

Primeiramente, foi realizada a dissolução de 0,0196 g de AgNO₃ em 3,75 mL de água deionizada. Em seguida, foram adicionados 10 mL de tolueno (precursor para fase orgânica) juntamente com 0,2735 g do agente transferidor de fase brometo de tetraoctilamônio (N(C₈H₁₇)₄Br). O agente transferidor é adicionado à solução aquosa sob agitação constante e após adição de todo o transferidor de fase, espera-se 10 minutos e adiciona-se 50,4 µL de

dodecanotiol que atua como passivante estabilizando as nanopartículas, também sob agitação constante. Após dois minutos adiciona-se 0,04728 g do agente redutor (NaBH_4) dissolvido em 3,125 mL de água deionizada.

O sistema reacional fica sob agitação por 3 horas para a obtenção das nanopartículas passivadas dispersas em tolueno. Essa dispersão apresenta uma coloração marrom avermelhada. A dispersão é separada e resfriada a -18°C por 1 hora sendo adicionados 40 mL de etanol antes de resfriá-la. A dispersão é centrifugada após uma hora de resfriamento e lavada três vezes com 10 mL de etanol a cada lavagem, onde após a separação das nanopartículas, as mesmas são dispersas em 10 mL de tolueno e armazenadas.

3.2.2 Caracterização estrutural das NPAg por difração de Raio X

Para verificar a forma estrutural das NPAg quimicamente sintetizadas pelo método bifásico, medidas foram realizadas através da técnica de difração de Raio X. Uma alíquota da dispersão foi depositada em um substrato de vidro e submetida às análises para obtenção do difratograma da amostra. Para a realização das medidas de difração de Raios-X utilizou-se um aparelho Shimadzu XRD-6000, disponível no laboratório de Difração de Raio X da Universidade Federal do Paraná. O aparelho foi operado aplicando radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), operando com voltagem de 40 KV e corrente de 30 mA.

3.2.3 Caracterização das NPAg por Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

As medidas de Espalhamento dinâmico de luz (DLS) foram realizadas utilizando um instrumento NANOTRAC NAS 35 com um feixe de detecção variando de 0,8 a 6500 nm. Para a realização desta análise foram adicionados 300 μL de tolueno em 5 μL da dispersão de nanopartículas em tolueno e esta amostra submetida previamente a um banho de ultrassom durante 15 minutos.

3.2.4 Preparação dos Eletrodos Quimicamente Modificados

3.2.4.1 Modificação dos Eletrodos com nanopartículas de prata quimicamente sintetizadas

Foram utilizados três tipos de eletrodos base para modificação com as nanopartículas de prata: Eletrodo de carbono vítreo (ECV, $\phi = 2$ mm), Eletrodos impressos (EI) a base de carbono fabricados pela Oxley development (Figura 12) e Eletrodos de vidro modificados com óxido de estanho dopado com índio (ITO), gentilmente cedidos pelo grupo de eletroanalítica da Universidade Federal de São Carlos. A modificação da superfície desses eletrodos foi realizada através da simples adição da dispersão sobre as superfícies dos substratos seguida da evaporação do solvente. A deposição da dispersão de NPAg foi realizada com o auxílio de uma micropipeta de volume variável de 0,1 μL a 2,0 μL . O volume adicionado sobre a superfície dos eletrodos foi de 1,0 μL .

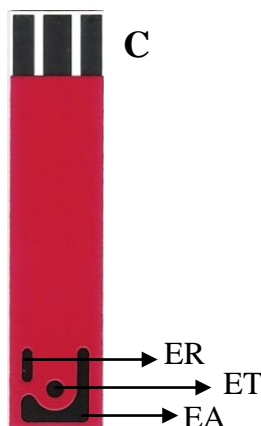


Figura 12 - Eletrodos impressos produzidos pela Oxley development, onde ET - eletrodo de trabalho ($\phi = 2$ mm), ER - eletrodo de referência e EA - eletrodo auxiliar ou contra eletrodo.

3.2.4.2 Modificação dos Eletrodos com nanopartículas de prata eletrodepositadas

Para as análises utilizando eletrodos modificados com nanopartículas eletrodepositadas utilizou-se um método descrito na literatura para a eletrodeposição dessas nanopartículas [101]. Foi utilizado como substrato de deposição o ECV, onde sua superfície foi pré-tratada com a realização de 10 ciclos no sentido anódico, variando de -0,65 V a 1,2 V, em meio de ácido sulfúrico (H_2SO_4) $0,50 \text{ mol L}^{-1}$, aplicando uma velocidade de 100 mV s^{-1} , com o intuito de realizar a limpeza da superfície.

Após esse pré-tratamento, foi realizada a eletrodeposição das NPAg utilizando-se da técnica de voltametria cíclica, onde foram realizadas varreduras cíclicas de potencial (10 ciclos) no sentido catódico, variando de 0,2 V até -0,34 V, em solução contendo $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de AgNO_3 e $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de KNO_3 , empregando uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Além do eletrodo de trabalho utilizado (ECV) foi também empregado um eletrodo de auxiliar de platina e um eletrodo de referência de Ag/AgCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl .

3.2.4.3 Preparação dos Eletrodos Modificados com Hexacianoferrato de prata (AgHCF)

A deposição do AgHCF sobre as NPAg foi realizada em diferentes eletrodos base (ECV, ITO e EI) utilizando o método potenciodinâmico (voltametria cíclica) e galvanostático. A preparação do modificador pelos dois procedimentos descritos foi realizada empregando um conjunto de três eletrodos: eletrodo de trabalho (eletrodos modificados com NPAg), eletrodo auxiliar de platina e um eletrodo de referência de Ag/AgCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl .

O método potenciodinâmico [102], consistiu na deposição do AgHCF realizando varreduras cíclicas de potencial (10 ciclos) variando o potencial entre -0,5 V a 1,2 V no sentido anódico a uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} em uma solução contendo $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ em um pH 3,0 para os eletrodos modificados com NPAg.

O procedimento galvanostático [103], consistiu na aplicação de uma corrente constante de 2,5 μA durante um tempo de 60 s na superfície dos eletrodos modificados em solução contendo $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. O estudo de otimização dos parâmetros aplicados ao processo de formação do AgHCF sobre as superfícies de NPAg quimicamente sintetizadas, foi realizado utilizando como eletrodo base o eletrodo impresso (EI).

A intensidade de corrente aplicada à superfície do eletrodo foi estudada com os seguintes valores: 1,0 μA - 1,5 μA - 2,0 μA - 2,5 μA - 3,0 μA e 4,0 μA por 60 s em solução de KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

Foram estudados diferentes tempo de aplicação de corrente: 30 s, 60 s, 120 s, 300 s, 600 s e 1200 s, mantendo uma corrente de 2,5 μA por 60 s em solução de KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

3.3 Caracterização dos Eletrodos Modificados

3.3.1 Medidas de Espectroscopia Raman

Foram realizadas com eletrodos (ITO) modificados por NPAg e AgHCF utilizando um espectrofotômetro Renishaw Raman Imaging Microprobe System 3000 (acoplado a um microscópio óptico) equipado com um laser He-Ne com potência de incidência de 2 mW em uma faixa espectral analisada de 1400 a 3100 cm^{-1} .

3.3.2 Medidas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raio X (EDS ou EDX)

Foram realizadas medidas de MEV da superfície dos EI sem modificação e modificados com NPAg e AgHCF. Para a realização das

medidas de MEV, as superfícies dos eletrodos foram metalizadas em uma metalizadora BAL-TEC, modelo SCD005 através da deposição de uma fina camada de ouro. As medidas foram realizadas utilizando um aparelho de MEV da JEOL, modelo 6360LV acoplado a um aparelho EDS da marca GATAN que opera com um feixe de elétrons com uma voltagem de 15 kV.

3.4 Medidas potenciométricas

A caracterização potenciométrica foi realizada empregando titulações potenciométricas, onde foi preparada uma solução de cloreto de potássio (KCl) com concentração aparente de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, sendo que 10 mL dessa solução foram adicionados a 10 mL de KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ no intuito de aumentar a força iônica, uma vez que a presença de íons K^+ e NO_3^- não influenciam no potencial desenvolvido, sendo esta solução titulada com uma solução de AgNO_3 $0,0485 \text{ mol L}^{-1}$ padronizada com uma solução de cloreto de sódio (NaCl) utilizando 0,06 g do padrão primário. A titulação foi realizada com os dois eletrodos indicadores (ECV-NPAg e Ag *Bulk*) na mesma célula de medida juntamente com o eletrodo de referência (Ag/AgCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl) sob agitação constante por um agitador e uma barra magnética. Sendo que os respectivos potenciais desenvolvidos foram observados a cada adição do titulante e medidos simultaneamente para os dois eletrodos. Os valores de potencial obtidos foram plotados em função do volume do titulante observado através da bureta (25 mL) empregada nas titulações.

3.5 Medidas Voltamétricas

Todas as medidas voltamétricas foram realizadas em um Potenciostato/Galvonostato μ -Autolab Tipo III da Metrohm, empregando uma célula eletroquímica contendo três eletrodos.

3.5.1 Caracterização eletroquímica de NPAg quimicamente sintetizadas

A caracterização eletroquímica dos eletrodos modificados com NPAg quimicamente sintetizadas foi realizada através da técnica de voltametria cíclica (VC) utilizando-se um sistema simples de 3 eletrodos, sendo eletrodo de trabalho o eletrodo de carbono vítreo (ECV) modificado com NPAg, eletrodo auxiliar (contra eletrodo) de platina (Pt), e como eletrodo de referência empregou-se Ag/AgCl 3,0 mol L⁻¹ de KCl. Utilizou-se uma célula eletroquímica de 10 mL e como eletrólito suporte utilizou-se uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,10 mol L⁻¹. As medidas foram realizadas em uma faixa de potencial de -0,4 V até 0,9 V realizando a varredura no sentido anódico, tendo esta uma velocidade de 100 mV s⁻¹.

3.5.2 Medidas voltamétricas na presença de glicerol

A potencialidade analítica do eletrodo modificado com NPAg quimicamente sintetizadas foi investigada na ausência e na presença de 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ de glicerol preparado em uma solução de NaOH 0,10 mol L⁻¹. As medidas foram realizadas através de varreduras cíclicas no intervalo de potencial de -0,2 V a 1,0 V à uma velocidade de 100 mV s⁻¹.

3.5.3 Caracterização voltamétrica dos eletrodos modificados com AgHCF

Para avaliar melhor o AgHCF modificado sobre a superfície das NPAg foram realizadas medidas para a caracterização do modificador obtido. A caracterização consistiu em verificar a resposta obtida em função da intercalação do cátion.

3.5.3.1 Estudo voltamétrico na presença de íons K^+ e Ag^+

Foram realizados experimentos de voltametria cíclica na presença de íons K^+ e Ag^+ avaliando o perfil voltamétrico obtido para cada cátion empregado para as seguintes condições: faixa de potencial: -0,2 a 1,2 V, velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} e pH da solução de leitura pH 3,0, mudando apenas o eletrólito empregado. Para o voltamograma obtido para íons K^+ foi utilizada uma solução de KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, e para o voltamograma obtido na presença de íons Ag^+ foi utilizada uma solução de $AgNO_3$ $0,01 \text{ mol L}^{-1}$.

O estudo de voltametria cíclica empregando o EI-AgHCF foi realizado em solução de KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ empregando diferentes velocidades de varredura, sendo estas: 10, 15, 25, 50, 75, 100, 150 e 200 mV s^{-1} , onde foi realizada uma comparação entre os perfis obtidos. A partir dos voltamogramas obtidos para cada velocidade foi feita uma correlação entre a intensidade de corrente anódica e catódica em função da raiz quadrada da velocidade de varredura.

3.5.3.2 Estimativa da quantidade aparente do modificador na superfície do eletrodo

A estimativa da quantidade aparente de NPAg e AgHCF na superfície do eletrodo impresso foi realizada utilizando o voltamograma obtido no estudo de diferentes velocidades de varredura empregando 10 mV s^{-1} em solução de KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. Para tal, o voltamograma cíclico teve o eixo de potencial aplicado normalizado para tempo através da velocidade empregada, assim foi obtido um gráfico de corrente em função do tempo. A partir do gráfico normalizado pode ser feita uma estimativa da carga média integrando a área dos picos anódicos e catódicos e fazendo uma média entre os dois valores. Com base nesses valores foi possível fazer uma estimativa da quantidade de NPAg depositadas na superfície eletródica.

3.5.3.3 Estudo de repetibilidade e reprodutibilidade

A repetibilidade do perfil voltamétrico obtido para o eletrodo modificado e a reprodutibilidade do processo de modificação do mesmo foram investigadas. Para a realização das medidas de repetibilidade um EI-AgHCF prepara-se o mesmo nas condições otimizadas e este é submetido sucessivamente (5 análises) ao processo de leitura (KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ – $\text{pH} = 3$). Após a varredura de 5 ciclos e consecutiva estabilização do sinal, cada leitura gerou um voltamograma onde as correntes foram amostradas.

Para as medidas de reprodutibilidade, diferentes eletrodos ($n=5$) foram confeccionados pelo método galvanostático nas condições estudadas já citadas anteriormente. Cada eletrodo confeccionado foi submetido ao processo de leitura (KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ – $\text{pH} = 3$), realizando 5 ciclos para cada eletrodo estudado, obtendo-se assim um voltamograma representativo para cada eletrodo estudado. Posteriormente, a comparação entre os perfis obtidos e a intensidade dos processos redox foi realizada.

3.5.4 Verificação da potencialidade analítica do eletrodo modificado com AgHCF como sensor para isoniazida (INZ)

A potencialidade de aplicação do EI-AgHCF como sensor para a determinação de INZ foi investigada por um estudo comparativo entre o perfil voltamétrico obtido em solução de KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ no intervalo de potencial entre $-0,2$ e $1,2 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl , KCl 3 mol L^{-1}) a 50 mV s^{-1} para eletrodo impresso não modificado e modificado com AgHCF na ausência e na presença de INZ ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Uma curva analítica também foi obtida nas mesmas condições para concentrações de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de INZ.

3.6 Determinação amperométrica de INZ empregando um sistema de Análise por Injeção em Fluxo (FIA)

O eletrodo modificado (EI-AgHCF) foi empregado como um sensor amperométrico para a determinação de INZ empregando o sistema de análise por injeção em fluxo (FIA). Para a realização das análises utilizou-se um sistema em linha única, constituído por uma bomba peristáltica Ismatec Tipo IPS - 12 (P), um injetor comutador (I), uma alça de amostragem (L), detector (célula eletroquímica) (D), tubos conectores e o software (R) para a leitura das análises. A célula de detecção e a configuração do sistema utilizado são mostradas na Figura 13A e 13B, respectivamente.

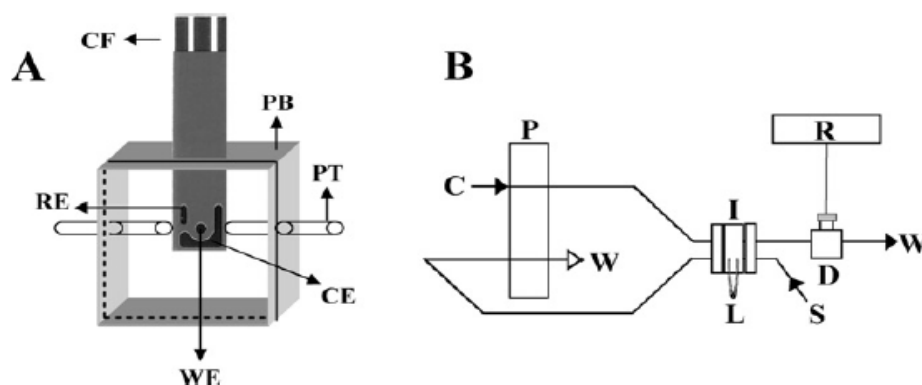


Figura 13 - A) Configuração da célula eletroquímica utilizada; B) Configuração do sistema FIA utilizado na realização das análises.

A célula eletroquímica é construída em poliuretana (PB), nesse compartimento o eletrodo impresso contendo o arranjo de três eletrodos, é acoplado, posteriormente a célula é conectada ao sistema FIA, sendo a solução transportadora e a amostra conduzidas até a célula eletroquímica por um tubo de taygon (PT) proporcionando um fluxo paralelo em relação a superfície eletródica. A configuração empregada para o sistema utilizado foi em linha única, onde além dos constituintes citados anteriormente, mostra a bomba peristáltica (P), a entrada da solução transportadora (C), entrada da amostra (S), o descarte (W) e a célula eletroquímica (D) acoplada ao potenciostato (R).

3.6.1 Otimização dos parâmetros empregados no sistema FIA

Foi avaliada a influência do potencial aplicado no sinal transiente variando-se os potenciais aplicados ao eletrodo de trabalho, os valores foram escolhidos com base no perfil voltamétrico sendo investigados os valores: 300, 350, 400, 450, 500 e 550 mV (vs. C_{impresso}). Utilizou-se para as análises um volume da alça de amostragem de 200 μL , uma vazão aplicada de 2,9 mL min^{-1} e concentração de INZ foram de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Realizando as medidas dos diferentes potenciais aplicados em triplicatas.

O estudo para verificar qual melhor volume de alça de amostragem utilizada foi realizado em triplicadas para cada alça de amostragem empregada, onde os valores de alça estudados foram de: 25, 50, 100, 200 e 300 μL . Utilizando um potencial aplicado de 450 mV, vazão de 2,9 mL min^{-1} e concentração de INZ de $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Foram estudadas vazões de 1,5 mL min^{-1} , 2,0 mL min^{-1} , 2,9 mL min^{-1} e 3,7 mL min^{-1} . Sendo fixados os seguintes parâmetros: potencial aplicado de 450 mV, volume da alça de amostragem de 200 μL e injeções de uma solução contendo uma concentração de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de INZ. Realizando as medidas em triplicadas para cada vazão empregada.

3.6.2 Construção da curva analítica para a determinação de INZ utilizando o sistema FIA

Foram realizadas medidas em triplicatas para a determinação de diferentes concentrações de INZ: 5, 10, 50, 100, 300 e 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Empregando as melhores condições: potencial de +0,45 V (vs. C_{impresso}), volume de alça de amostragem de 200 μL , e vazão de 2,9 mL min^{-1} .

3.6.3 Estudo de possíveis interferentes

Foram realizadas medidas de determinação de INZ empregando o AgHCF na presença de alguns possíveis interferentes: dopamina (DA), ácido ascórbico (AA), glicose e rifampicina (RIF). Para todas as substâncias analisadas foi realizada uma comparação entre os sinais (em triplicatas) obtidos para a solução de, apenas, INZ em uma concentração de $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ com os sinais obtidos para as soluções contendo os possíveis interferentes na presença de INZ na mesma concentração utilizada anteriormente. As concentrações dos potenciais interferentes continham um teor dez vezes menor, igual e dez vezes maior que a concentração de INZ, $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.

3.6.4 Determinação de INZ em uma amostra de urina sintética enriquecida

Para as medidas na presença de urina sintética, foi escolhida uma formulação descrita por Silva e colaboradores [104]. A amostra foi preparada dissolvendo-se as seguintes quantidades: 1,100 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2,925 g de NaCl, 1,600 g de KCl, 2,25 g de Na_2SO_4 , 1,40 g de KH_2PO_4 , 1,000 g de NH_4Cl e 25,0 g de uréia em 1 litro de água destilada. Após a dissolução, a solução de urina sintética foi fortificada com INZ dissolvida em KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e o pH ajustado para 3,0 para uma concentração final de $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de INZ.

Foram realizadas injeções de diferentes concentrações de INZ de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida realizaram-se três injeções de soluções devidamente preparadas da amostra de urina sintética contendo $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de INZ. Após a injeção da amostra, soluções conhecidas de INZ foram novamente injetadas as soluções padrão no sentido decrescente, para verificar possíveis efeitos de envenenamento.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização da estrutura e tamanho das nanopartículas de prata (NPAg)

4.1.1. Análise das NPAg por Difração de Raio-X

A síntese de nanopartículas via rota química tem como característica a obtenção de materiais com dimensões bastante reduzidas, da ordem de poucos nanômetros. Visando caracterizar a estrutura cristalina e estimar o tamanho das nanopartículas, foram realizadas medidas de difração de Raios-X. A Figura 14 apresenta o resultado obtido.

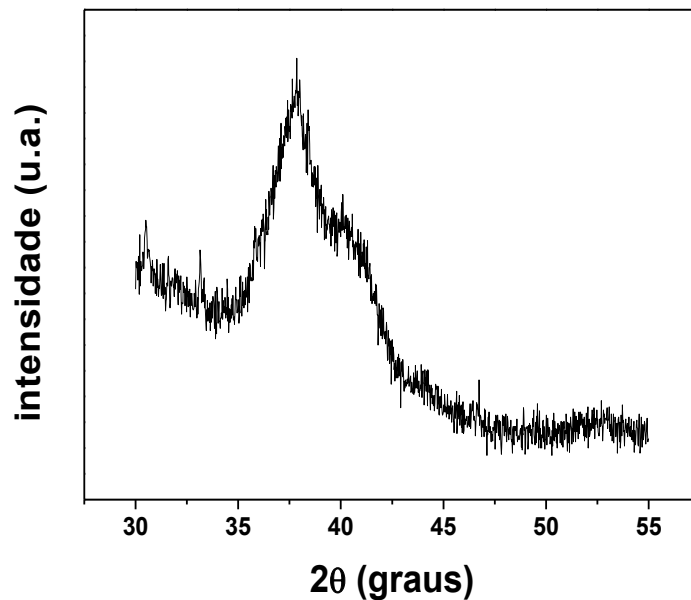


Figura 14 - Difratograma de Raios-X referente as NPAg, angulação do feixe igual a 2θ .

Os planos de difração, as respectivas distâncias interplanares e as densidades de átomos (elétrons) ao longo de cada plano cristalino são características específicas e únicas de cada substância cristalina [105]. Um

banco de dados contendo informações cristalográficas básicas é mantido continuamente atualizado pelo JCPDS-ICDD, *Joint Committee on Powder Diffraction Standards - International Center for Diffraction Data*, com sede nos Estados Unidos da América (EUA) [106]. Atualmente, são disponíveis informações referentes a mais de 70.000 compostos cristalinos, sendo que as mais importantes para identificação são as distâncias interplanares e as intensidades difratadas normalizadas (relativas a 100 %). Assim, analisando o difratograma obtido para a amostra, pode-se determinar sua estrutura cristalina comparando com o padrão de difração. A partir do difratograma de Raios-X, também é possível obter uma estimativa do tamanho das nanopartículas.

Analisando o difratograma de Raios-X obtido para o material sintetizado, verifica-se que as NPAg possuem estrutura cristalina cúbica de face centrada – cfc – de acordo com o padrão do difratograma da prata comparado (JCPDS 87 0719). A partir da posição e da largura a meia altura do pico de maior intensidade (100 %), foi estimado o tamanho médio das partículas, utilizando a lei de Sherrer:

$$D = k \cdot \lambda / \beta \cdot \cos \theta$$

Onde: D é o diâmetro médio das partículas, k é uma constante da forma da estrutura, λ é o comprimento de onda dos Raios X ($K_{\alpha} = 1.5418 \text{ \AA}$), β é a largura a meia altura do pico, θ é o ângulo de Bragg do pico (hkl).

O tamanho médio aproximado das nanopartículas foi estimado em 5 nm. O termo “aproximado” está relacionado às dificuldades de interpretação de dados experimentais para nanopartículas de tamanho muito reduzido [107].

4.1.2. Análise das NPAg por Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

Com o intuito de estimar a dispersão de tamanho mais preciso das NPAg quimicamente sintetizadas, foram realizadas medidas de DLS (Espalhamento de Luz Dinâmico) que é uma técnica mais confiável perante a técnica de raio X. A técnica é baseada na incidência de luz sobre um material,

o campo elétrico da luz induz uma polarização de elétrons na amostra, que por sua vez, fornecem uma fonte de luz secundária e dispersam a luz incidente. As mudanças de frequência, distribuição angular, polarizações e intensidade da luz de dispersão são determinadas pelo tamanho, forma e interações no material de espalhamento [108]. Assim, com o espalhamento apresentado pela dispersão do material, pode-se fazer uma estimativa do tamanho das partículas em solução. A Figura 15 mostra o gráfico de dispersão de tamanho obtido para a amostra de NPAg quimicamente sintetizadas.

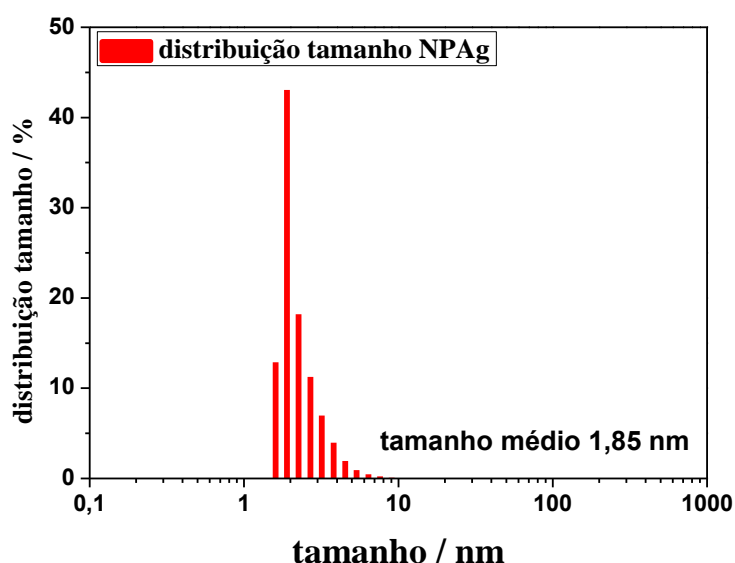


Figura 15 - Gráfico da distribuição percentual em função do diâmetro das NPAg obtido através da técnica de DLS.

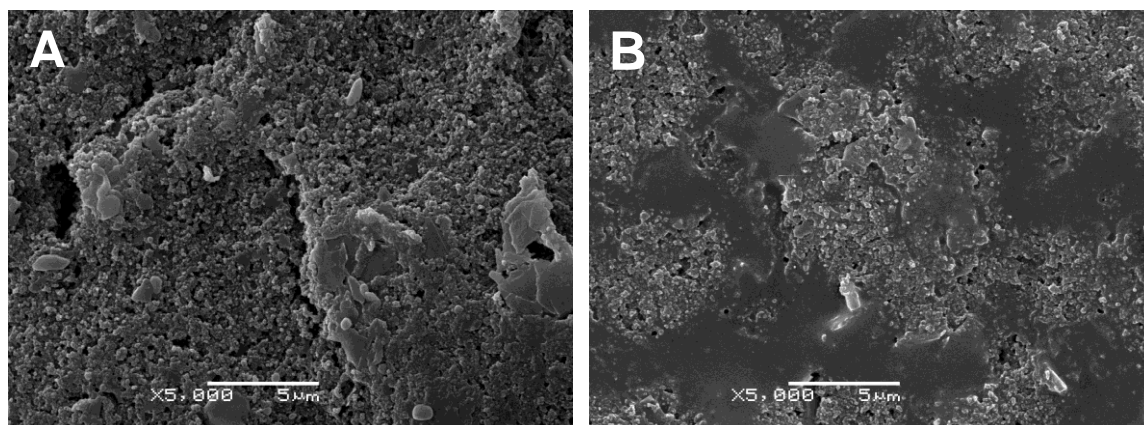
Observando a Figura 15, é possível verificar a distribuição de tamanho das NPAg entre 1 nm e 10 nm. Esse valor é concordante com o resultado obtido por difração de Raio X, que apresentou um tamanho estimado de 5 nm. As NPAg apresentaram um tamanho médio de 1,85 nm (45 % da amostra), como observado para a coluna com maior intensidade. Com os resultados obtidos pela técnica de DLS, pode-se comprovar o tamanho bastante reduzido das nanopartículas sintetizadas pelo método bifásico, confirmando o sucesso da síntese.

4.2 Caracterização dos eletrodos

4.2.1 Caracterização da morfologia e da composição química superficial dos eletrodos não modificados e modificados

Para verificar as características da superfície dos eletrodos não modificados e o efeito da modificação por NPAg e AgHCF foram realizadas medidas de microscopia eletrônica de varredura (MEV). As análises foram feitas utilizando os EI não modificado, EI modificado com as NPAg e EI modificado com AgHCF, obtendo-se imagens com aumento de 5 e 10 mil vezes da superfície dos eletrodos. Além das imagens da superfície, analisou-se a composição química, através da técnica de Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDX) acoplada ao MEV.

As imagens obtidas para os EI e EI-NPAg são apresentadas nas Figuras 16A e 16B (aumento de 5 mil vezes), Figuras 16C e 16D (resolução de 10 mil vezes) e para o EI-AgHCF, as imagens com resolução de 10 e 5 mil vezes, estão mostradas nas Figuras 16E e 16F, respectivamente.



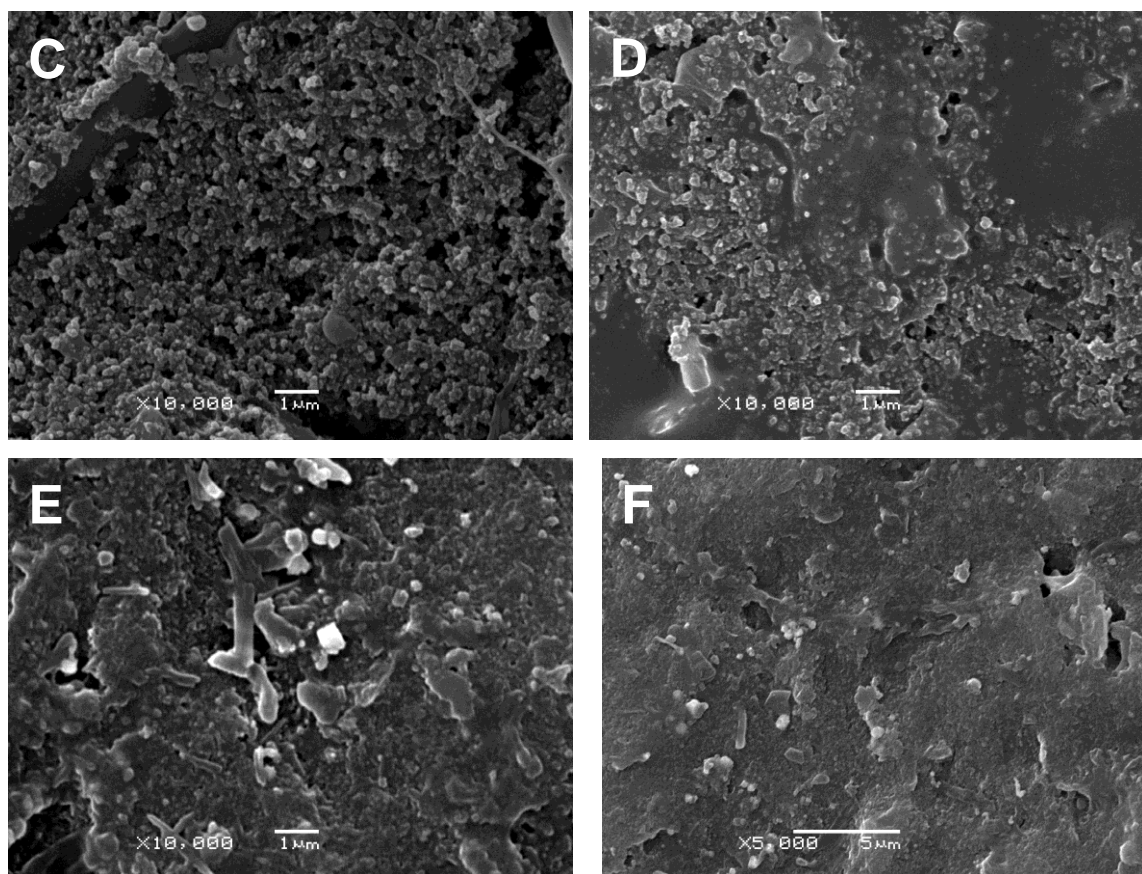


Figura 16 - Imagens de MEV da superfície dos eletrodos; A) EI não modificado, e B) EI modificado com NPAg, para a resolução de 5 mil vezes; C) EI não modificado, D) EI modificado com NPAg, para a resolução de 10 mil vezes, E) EI-AgHCF resolução de 10 mil vezes, e F) EI-AgHCF resolução de 5 mil vezes.

Observando as imagens obtidas para o eletrodo impresso não modificado é verificada uma superfície altamente rugosa. Essa característica é de grande importância do ponto de vista eletroanalítico, uma vez que a presença de uma superfície rugosa implica diretamente em uma elevada área superficial e consequentemente um ganho de sensibilidade.

Comparando as imagens obtidas não é possível observar uma diferença clara entre as superfícies dos eletrodos impressos não modificados e modificados, tanto para as imagens com aumento de 5 mil, quanto para as imagens de 10 mil vezes. Do ponto de vista morfológico, não é verificada grande alteração entre os eletrodos modificados ou não e, além disso, não é possível fazer qualquer afirmação quanto ao tamanho das NPAg, devido a resolução da técnica empregada. Para o EI-AgHCF, também não foi observada diferença significativa entre os outros eletrodos avaliados (EI e EI-NPAg).

Medidas de EDX ou EDS (*Energy Dispersive Spectroscopy*) fornecem informações a respeito da composição química das amostras analisadas. As medidas são fundamentadas no bombardeamento da superfície da amostra por um feixe de elétrons de alta energia (15 kV), o que provoca a ejeção de elétrons dos átomos que compõe a superfície. As vacâncias deixadas pelos elétrons ejetados são preenchidas por elétrons de um estado energético mais elevado e um Raio-X é emitido para equilibrar a diferença de energia entre o estado dos dois elétrons. A energia do Raio-X liberado é característica de cada elemento e, assim, uma análise da composição química da superfície bombardeada é possível. A técnica não é adequada para informações quantitativas, mas fornece informações quanto à composição qualitativa, permitindo uma comparação entre as superfícies dos eletrodos não modificados e modificados. Os resultados obtidos referentes à composição da superfície dos EI não modificado, EI-NPAg e EI-AgHCF são mostrados nas Figuras 17A, 17B e 17C, respectivamente.

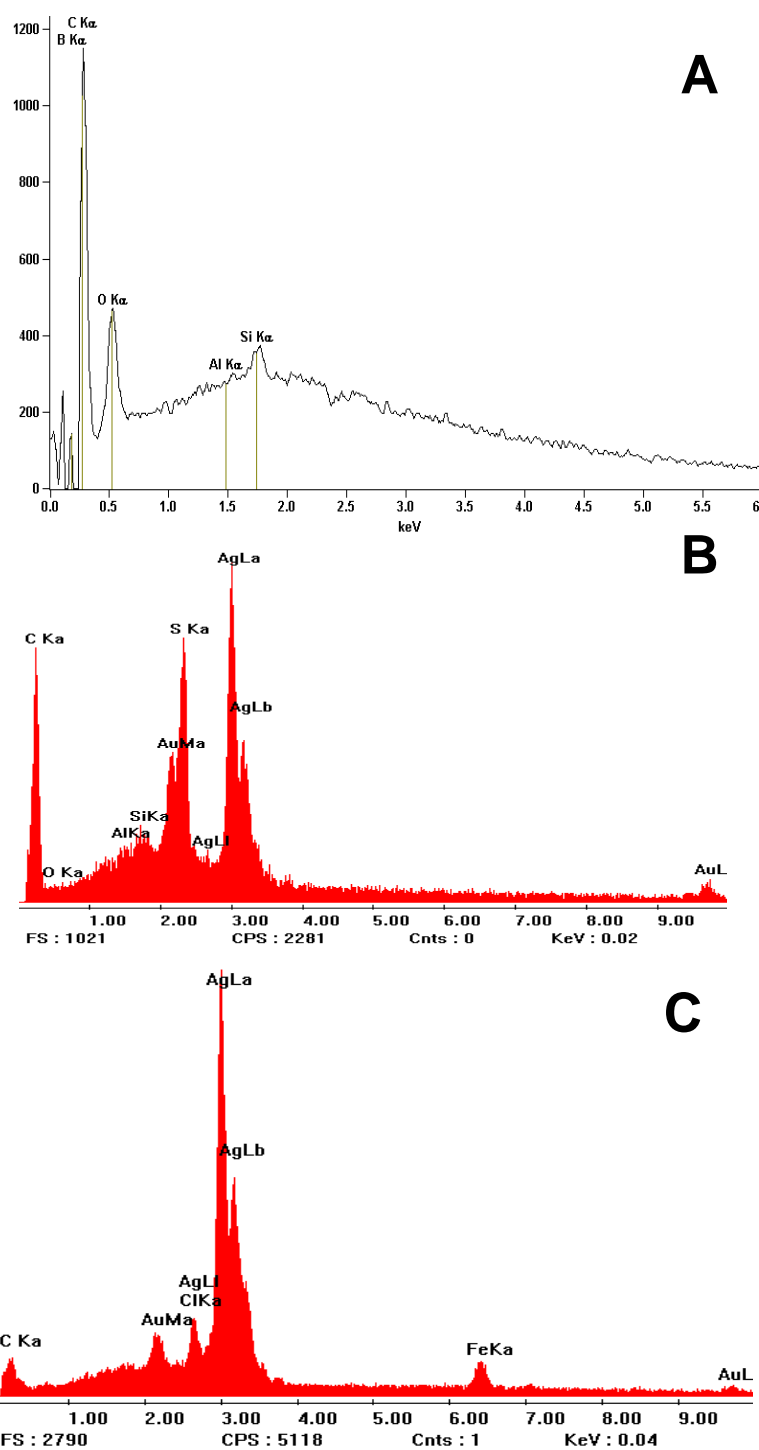


Figura 17 - Espectro de Energia Dispersiva (EDX) referente à composição química A) EI não modificado; B) EI-NPAg; C) EI-AgHCF.

A diferença entre a formatação dos espectros referentes as Figura 17A, 17B e 17C é devido a realização da medida em equipamentos diferentes. Porém, isso não influencia os resultados obtidos.

A Figura 17A mostra os resultados da análise da composição química da superfície do eletrodo EI não modificado. É possível verificar sinais referentes

aos elementos contidos na superfície do eletrodo, como carbono e ouro. O pico atribuído ao carbono apresenta maior intensidade, uma vez que a superfície analisada (eletrodo de trabalho) é composta basicamente por carbono e não há outros contaminantes na superfície do eletrodo. O pico observado para o ouro é devido à metalização da superfície do eletrodo pelo respectivo metal, a qual é essencial para a realização da medida.

A análise da composição química da superfície do EI modificado apenas com NPAg é mostrado na Figura 17B. O espectro obtido para esse eletrodo mostra sinais referentes ao carbono, ao ouro e também à prata e ao enxofre. Esses sinais sugerem a presença das NPAg na superfície eletródica, sendo o pico do enxofre associado ao grupo tiol, usado como passivante, incorporado na superfície das NPAg. Assim, com base nos estudos realizados, pode-se concluir que as NPAg depositadas por gotejamento da suspensão ficam incorporadas na superfície do EI após a evaporação do solvente.

A Figura 16C mostra os resultados obtidos para o eletrodo impresso modificado com AgHCF. Além dos sinais de prata e enxofre, verificados no eletrodo modificado com NPAg, também é possível observar o sinal referente ao ferro (Fe), evidenciando a sua presença na superfície eletródica. Essa observação comprova a formação do AgHCF na superfície do eletrodo, uma vez que não é observado a presença de ferro antes da deposição do ferricianeto. Assim, fica evidente que o processo de preparação do AgHCF sobre a superfície das NPAg é eficiente.

4.2.2 Espectroscopia Raman dos eletrodos não modificados e modificados por AgHCF

Para certificar a existência do AgHCF incorporado sobre a superfície eletródica foram realizadas medidas de espectroscopia Raman dos eletrodos modificados com NPAg e AgHCF.

A espectroscopia Raman é uma técnica que usa uma fonte monocromática de luz, a qual, quando incidida sobre um material, é espalhada por ele de duas diferentes formas, gerando luz de mesma energia ou de energia diferente da incidente. No primeiro caso, o espalhamento é chamado

de espalhamento elástico e não é de interesse, mas, no segundo caso (espalhamento inelástico), a energia espalhada é diferente da energia incidente, onde a diferença de energia incidida e energia espalhada possibilita obter informações importantes a respeito da composição química do objeto. A diferença de energia entre a radiação incidente e a espalhada corresponde à energia com que átomos presentes na área estudada estão vibrando e essa frequência de vibração permite descobrir como os átomos estão ligados. Assim, é possível obter dados sobre geometria, arranjo das espécies químicas, entre outras informações [109]. O gráfico que representa a intensidade da radiação espalhada em função de sua energia é chamado de espectro Raman. Cada espécie química seja um pigmento, corante, substrato, aglutinante, entre outros, fornece um espectro característico.

Para evidenciar a presença do AgHCF depositado sobre a superfície das NPAg, foram realizadas medidas de espectroscopia Raman para o eletrodo modificado apenas com as NPAg e para o eletrodo contendo o AgHCF. Os espectros obtidos estão apresentados na Figura 18.

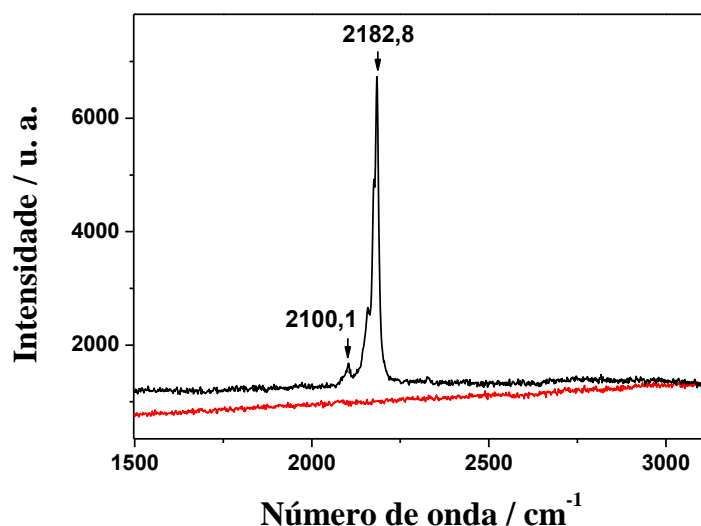


Figura 18 - Espectro Raman para o eletrodo modificado com NPAg (—) e para o eletrodo modificado com AgHCF sobre as NPAg (—).

Observando os resultados da Figura 18 é possível verificar uma diferença significativa entre os espectros Raman obtidos para o eletrodo contendo apenas NPAg e o modificado com AgHCF. Para o eletrodo preparado com NPAg, não foi observado nenhum sinal significativo na faixa de número de

onda mostrada; já o eletrodo modificado com AgHCF apresentou um pico menos intenso em $2100,1\text{ cm}^{-1}$ e outro mais intenso em $2182,8\text{ cm}^{-1}$. O primeiro corresponde ao estiramento de grupos cianetos livres e o segundo, observado em frequência mais alta, corresponde à vibração de grupos cianetos coordenados, como esperado para o AgHCF [110]. Assim, diante da diferença dos espectros e dos picos observados para o AgHCF, pode-se concluir que o eletrodo modificado com NPAg, submetido ao processo de deposição do ferricianeto de prata, possui esse mediador incorporado em sua superfície.

4.3 Caracterização do comportamento voltamétrico dos eletrodos modificados com NPAg

A caracterização eletroquímica das NPAg foi realizada empregando voltametria cíclica em solução de NaOH $0,10\text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte. Esta condição foi adotada devido ao comportamento voltamétrico do eletrodo de prata (*Bulk*) ser bem estabelecido nesse eletrólito, onde favorece a formação de óxidos [101]. Estudos nessas condições foram realizados apenas utilizando os eletrodos de carbono vítreo, pois os EI apresentam o inconveniente da baixa resistência física de seus componentes nessa solução.

Medidas de voltametria cíclica foram realizadas variando o potencial de -0,5 V a 0,9 V (vs. Ag/AgCl 3 mol L^{-1} KCl), utilizando uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . As medidas voltamétricas foram realizadas com eletrodos de carbono vítreo não modificado (ECV) e modificado com NPAg (ECV-NPAg). Os voltamogramas cíclicos típicos para o ECV e ECV-NPAg são mostrados na Figura 19.

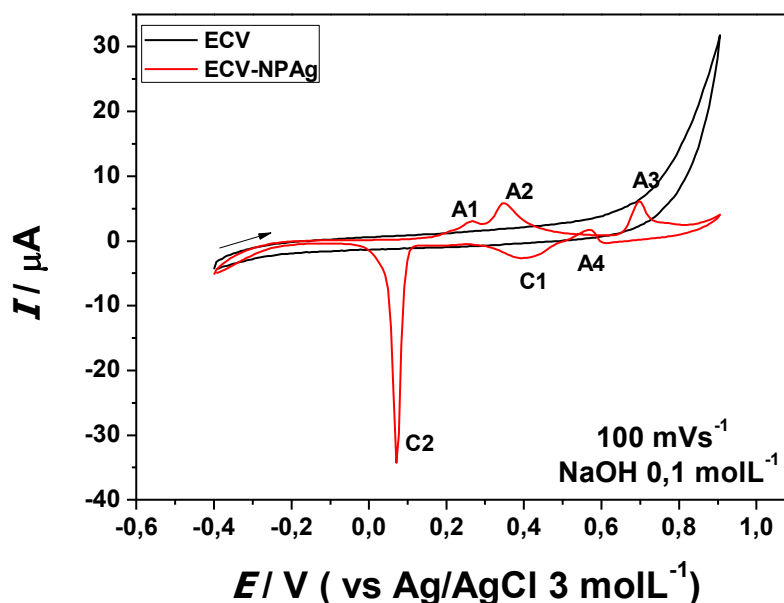
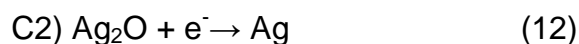
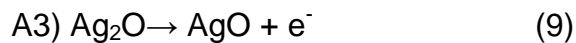
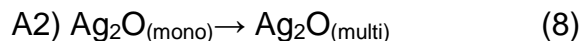
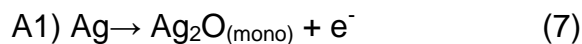


Figura 19 - Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de NaOH 0,10 mol L⁻¹ para os eletrodos de carbono vítreo não modificado (ECV) e modificado com nanopartículas de prata (ECV-NPAg).

O ECV não modificado apresenta um comportamento voltamétrico basicamente capacitivo para praticamente todo o intervalo de potencial avaliado, demonstrando assim que não existe espécie eletroativa em sua superfície ou em solução, uma vez que não foi observado processo redox. Já para o ECV-NPAg, é possível verificar a presença de diversos processos faradáicos; esses resultados sugerem que os processos são provenientes do material modificador, ou seja, das nanopartículas de prata. O voltamograma cíclico do eletrodo de carbono vítreo modificado (ECV-NPAg) apresenta três processos anódicos (A1, A2 e A3) em 0,26 V, 0,35 V e 0,69 V vs Ag/AgCl 3,0 mol L⁻¹ de KCl, respectivamente, e dois processos catódicos C1 em 0,38 V e C2 em 0,08 V (vs. Ag/AgCl, 3,0 mol L⁻¹ KCl).

Os resultados obtidos para ECV-NPAg são semelhantes àqueles relatados por Demott e colaboradores [111]. O pico de corrente A1 corresponde à oxidação da Ag⁰ para Ag⁺, formando uma monocamada de óxido de prata I (Ag₂O). O sinal A2 é atribuído à formação da multicamada de Ag₂O e A3 é referente à oxidação da Ag⁺ para Ag²⁺, formando óxido de prata II (AgO). Há também o aparecimento de um sinal de oxidação no sentido catódico (A4) em 0,57 V, associado ao processo auto-catalítico do Ag₂O para AgO. Os picos de redução C1 e C2 são referentes à redução da Ag²⁺ a Ag⁺, passando de AgO

para Ag_2O , e a redução do Ag_2O a Ag^0 , respectivamente [111]. Os processos descritos podem ser representados pelas equações de (7) a (12):



Visando verificar a semelhança no comportamento voltamétrico, um eletrodo de prata *Bulk* foi submetido às mesmas condições experimentais empregadas nos estudos conduzidos para as NPAg (ECV-NPAg). Um voltamograma cíclico típico é apresentado na Figura 20. Na mesma figura é mostrado o perfil voltamétrico obtido para o ECV-NPAg, para efeito de comparação.

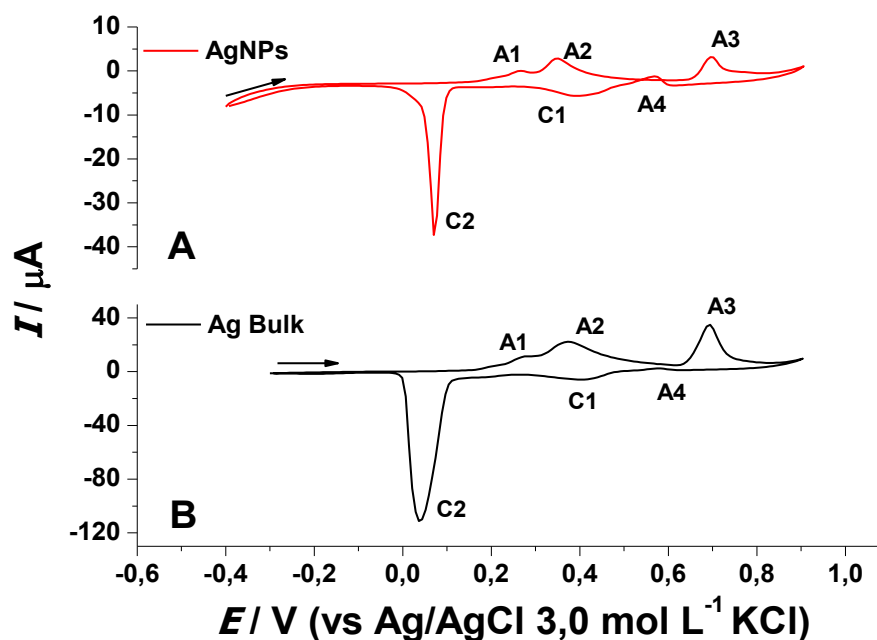


Figura 20 - Voltamogramas cíclicos obtidos para os eletrodos: ECV-NPAg (—) e eletrodo de prata Bulk (—), em solução de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, utilizando uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

Observando os resultados apresentados na Figura 20B, é possível verificar a presença de sinais anódicos e catódicos nos mesmos potenciais observados para o eletrodo modificado com as nanopartículas de prata, sugerindo, assim, que as nanopartículas de prata tem sua eletroatividade baseada em processos semelhantes aos relatados para eletrodos de prata *Bulk*. Esse comportamento voltamétrico também foi observado no trabalho desenvolvido por Park e colaboradores [101].

A influência do número de ciclos na estabilidade do perfil voltamétrico também foi investigada. Para isso, foi realizada uma série de varreduras sucessivas de potencial e observada a variação do perfil voltamétrico. A Figura 21 mostra os resultados obtidos.

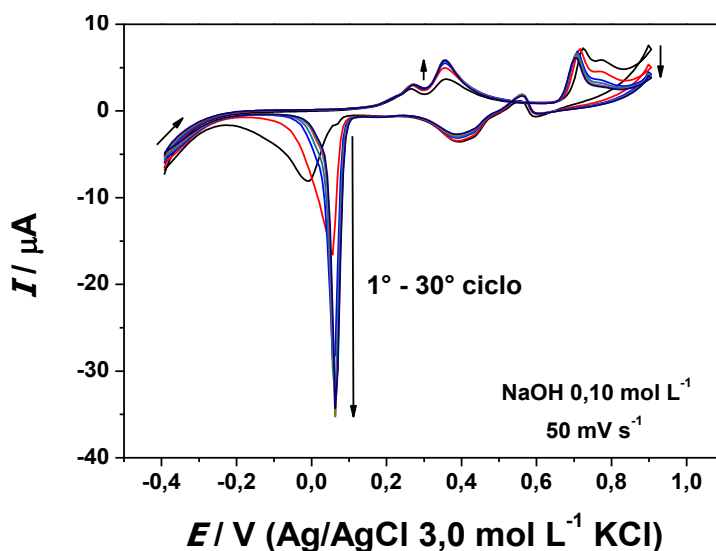


Figura 21 - Voltamogramas cíclicos sucessivos obtidos para o ECV-NPAg em meio de NaOH 0,10 mol L⁻¹, a uma velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹.

A intensidade dos picos de corrente e a definição dos mesmos aumentam com o número de ciclos e a partir do 25º ciclo observa-se uma estabilização da intensidade de corrente nos processos redox, provavelmente pela estabilização dos óxidos formados.

Foram preparados eletrodos modificados com nanopartículas de prata obtidas através da síntese eletroquímica [101], para efeito de comparação com as nanopartículas quimicamente sintetizadas neste trabalho. O método de modificação consiste na deposição eletroquímica de nanopartículas de prata na superfície de um substrato (ECV), a partir de uma solução contendo cátions

Ag^+ . Para isso, primeiramente foi realizado um pré-tratamento da superfície do ECV, através de varreduras sucessivas de potencial, em solução de H_2SO_4 $0,50 \text{ mol L}^{-1}$, variando o potencial de $-0,65 \text{ V}$ a $1,2 \text{ V}$. Esse pré-tratamento em meio ácido tem a finalidade de limpar a superfície do ECV, retirando qualquer possível interferente que possa influenciar no processo de eletrodeposição.

Após o pré-tratamento do eletrodo, foi realizada a eletrodeposição das NPAg usando o método potenciodinâmico, ou seja, realizando varreduras cíclicas de potencial no intervalo de $0,20 \text{ V}$ a $-0,34 \text{ V}$, em solução $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de KNO_3 contendo $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de AgNO_3 como precursor. A varredura foi iniciada em valores de potencial mais positivo, seguindo para valores negativos, com o objetivo de promover a redução de Ag^+ a Ag^0 . O método de preparação escolhido para a obtenção das nanopartículas na superfície do ECV (ECV-NPAg) foi proposto por Park e colaboradores [101].

Depois de realizado a etapa de formação da NPAg, os eletrodos foram avaliados em solução de NaOH , visando identificar os processos redox do material. Porém, não foi possível observar qualquer processo referente à formação de óxidos de prata em meio básico. Esses resultados sugerem que não houve a formação das NPAg adotando as condições relatadas.

Visando a obtenção de um depósito de prata sobre a superfície do eletrodo, a faixa de potencial para a deposição foi estendida para valores mais negativos. Um intervalo adequado para promover a redução dos íons prata foi estabelecido entre $0,2 \text{ V}$ e $-0,6 \text{ V}$ (10 ciclos). Os resultados obtidos durante a deposição de prata, usando uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} em solução de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de KNO_3 contendo $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de AgNO_3 , estão apresentados na Figura 22.

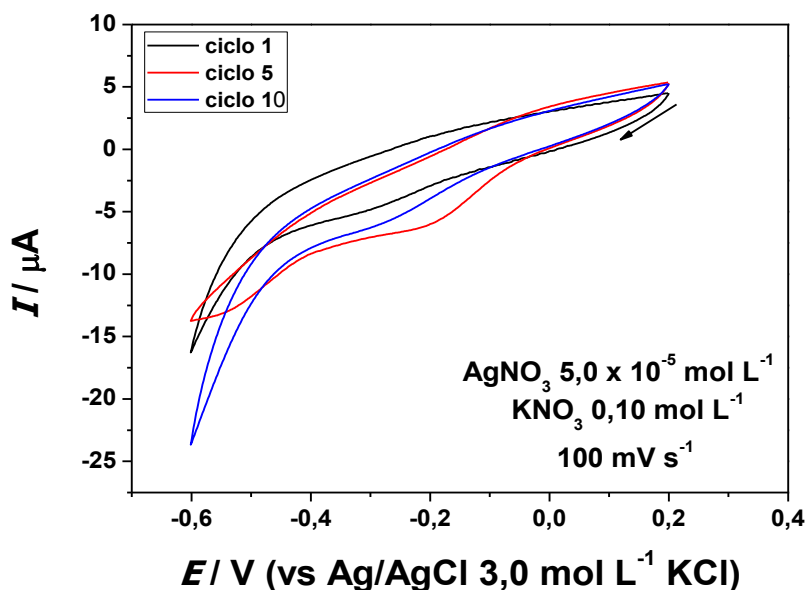


Figura 22 - Voltamogramas obtidos do ECV no processo de formação eletroquímica de NPAg em meio de KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e $AgNO_3$ $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ a 100 mV s^{-1} .

É possível verificar que depois de realizadas algumas varreduras sucessivas no intervalo de potencial, houve o surgimento de um pico de corrente catódico em -0,3 V, provavelmente devido à redução dos íons Ag^+ a Ag^0 .

Após a formação do depósito de prata através do método potenciodinâmico, o eletrodo de carbono vítreo modificado (ECV-NPAg-Elet) foi submetido a medidas de voltametria cíclica, nas mesmas condições empregadas na caracterização das NPAg sintetizadas quimicamente. O perfil voltamétrico obtido para as ECV-NPAg-Elet é observado na Figura 23.

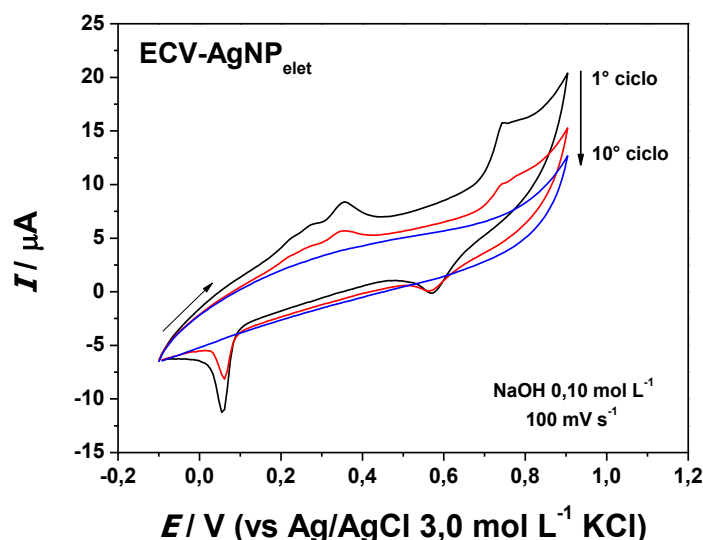


Figura 23 - Voltamogramas cíclicos obtidos para os eletrodos ECV-NPAg_{elet} em NaOH 0,10 mol L⁻¹, a uma velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹.

É possível observar picos de corrente, atribuídos a oxidação e redução, semelhantes aos verificados para as NPAg quimicamente sintetizadas e para o eletrodo de prata *Bulk*. Entretanto, o perfil voltamétrico para as nanopartículas obtidas eletroquimicamente não é mais observado a partir do décimo ciclo, sugerindo que esse eletrodo modificado não apresenta um perfil voltamétrico estável, ao contrário do eletrodo modificado com NPAg sintetizadas quimicamente. Embora exista a necessidade de realizar mais estudos quanto as condições adequadas para a eletrodeposição das NPAg, o sinal observado é muito semelhante aos processos verificados neste trabalho para a NPAg quimicamente sintetizadas.

O óxido de prata II (AgO) é uma espécie com grande potencial oxidativo ($\text{Ag}^{2+} \rightarrow \text{Ag}^+$ $E^0 = +1,98$ V) para diversas moléculas, como alcoóis e açúcares [101]. Visando verificar o potencial dos óxidos de prata na oxidação de determinadas substâncias, foi avaliado o comportamento do eletrodo modificado com NPAg na presença de glicerol. O glicerol é uma substância muito utilizada na indústria, devido a suas propriedades antioxidantes, sequestrantes, emulsificantes e umectantes, além de ser um importante subproduto da síntese do biodiesel [112]. Os voltamogramas cíclicos obtidos para o ECV-NPAg em solução de NaOH 0,10 mol L⁻¹, na ausência e na presença de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de glicerol, estão apresentados na Figura 24.

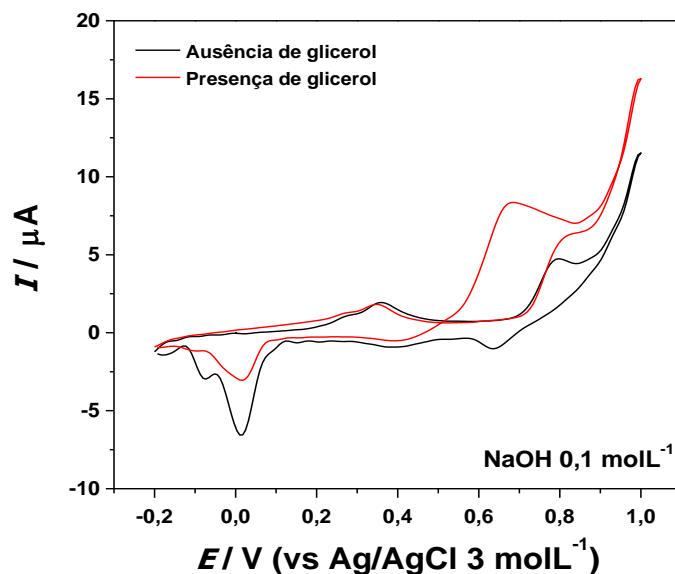


Figura 24 - Voltamogramas cíclicos obtidos para o ECV-NPAG, na ausência e na presença de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glicerol, em NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, a 100 mV s^{-1} .

Observando o perfil voltamétrico obtido para o ECV-NPAG, na ausência e na presença de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glicerol, é possível verificar o surgimento de um pico de oxidação no sentido catódico em $0,68 \text{ V}$, que não é observado para o ECV-NPAG em solução $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH. É provável que o glicerol seja oxidado quimicamente pelo AgO em um potencial de $0,8 \text{ V}$. Esse processo é acompanhado pela formação de Ag_2O , o qual é reoxidado no potencial de $0,68 \text{ V}$; nessa etapa é provável que ocorra também a oxidação de intermediários do glicerol. Um comportamento voltamétrico semelhante ao observado foi relatado para a oxidação da glicose, utilizando condições experimentais similares [101]. A glicose é oxidada através da reação química com Ag^{2+} (AgO), gerando Ag^+ (Ag_2O), que é reoxidado a Ag^{2+} . Além disso, é gerado um intermediário, o qual é oxidado pelo Ag_2O [111], gerando uma onda na varredura reversa. Assim, os resultados obtidos sugerem que foram formados óxidos de prata Ag^+ e Ag^{2+} , os quais se mostraram eletroativos para a oxidação catalítica do glicerol. O mecanismo proposto pode ser representado pelas equações de (13) a (15):





As NPAg mostraram potencial para a determinação voltamétrica de glicerol. Porém, essas condições tornam difícil a utilização de eletrodos impressos, devido à remoção da tinta isolante presente neste substrato. Assim, os estudos realizados em solução de NaOH serviram para elucidar o comportamento voltamétrico das nanopartículas de prata, sem possibilidade de aplicação dos EI nessas condições.

4.4 Caracterização do comportamento potenciométrico dos eletrodos modificados com NPAg

A grande vantagem de utilizar o método bifásico na síntese das NPAg consiste no controle do tamanho das nanopartículas, uma vez que as mesmas são passivadas pelo dodecanotiol no momento da redução. Entretanto, o passivante se apresenta como um material isolante podendo, assim, influenciar na atividade eletroquímica das nanopartículas. A caracterização voltamétrica das nanopartículas apresenta um perfil semelhante àquele obtido com o eletrodo de prata *Bulk* em meio alcalino. Esses resultados sugerem que a atividade eletroquímica das NPAg não é influenciada pela presença do passivante. Assim, visando confirmar esse comportamento, a atividade eletroquímica das nanopartículas foi avaliada como um eletrodo potenciométrico de primeira espécie [113]. Para isso, foi empregada uma titulação potenciométrica de íons Cl^- por íons Ag^+ , utilizando o ECV-NPAg e o eletrodo de prata *Bulk* como eletrodos indicadores. A Figura 25 mostra as curvas de titulação potenciométrica, obtidas para um eletrodo modificado com as NPAg e um eletrodo metálico de prata *Bulk*.

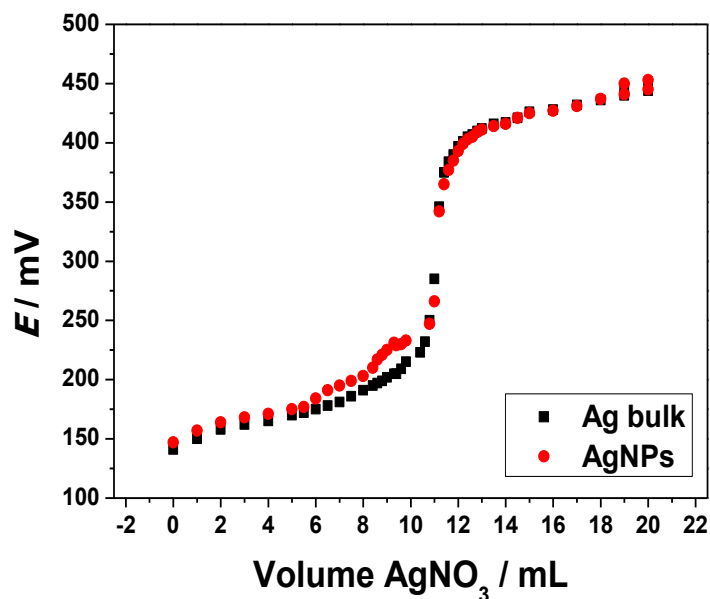


Figura 25 - Curvas de titulação potenciométrica de íons cloreto usando como titulante AgNO_3 $0,0485 \text{ mol L}^{-1}$ para eletrodos de prata Bulk e ECV-NPAg.

Com base nos resultados, é possível observar claramente que o perfil obtido é semelhante para os dois eletrodos, o que mostra que para análises potenciométricas, não há influência do passivante sobre a resposta do eletrodo contendo NPAg. Assim, os resultados sugerem que a presença do passivante não afeta a resposta potenciométrica das nanopartículas, uma vez que nenhuma variação significativa de potencial elétrico é observada à medida que ocorre a adição de AgNO_3 . O fato de não haver influência do passivante possibilita a construção de um sensor potenciométrico metálico de baixo custo, pois a cada síntese produz-se aproximadamente 10 mL de dispersão. Como a modificação é realizada utilizando apenas $1,0 \mu\text{L}$ da dispersão, é possível construir aproximadamente 10 mil eletrodos por síntese, usando cerca de 20 mg de AgNO_3 .

A semelhança dos perfis das curvas de titulação potenciométrica para os eletrodos ECV-NPAg e para o eletrodo de prata *Bulk* sugere que o eletrodo modificado com NPAg também se comporta como um eletrodo indicador metálico de primeira espécie. Um eletrodo de primeira espécie consiste em um eletrodo metálico (metal puro) que está em equilíbrio direto com seu cátion em solução. O eletrodo indicador de prata responde as variações de concentração de íons Ag^+ de acordo com a equação de Nernst: $E_{\text{ind}} = E_{\text{Ag}^+/\text{Ag}}^0 + (0,0592/n) \log a_{\text{Ag}^+}$, onde E_{ind} corresponde ao potencial desenvolvido no eletrodo indicador

(Ag^0), $E_{\text{Ag}^+/\text{Ag}}^0$ é o potencial padrão de redução da prata, n é o número de elétrons (nesse caso $n = 1$) e a_{Ag^+} é a atividade do íon Ag^+ [113].

Na Figura 25 pode ser observado que a partir da adição de 6,0 mL do titulante ocorre um deslocamento no perfil da curva para o ECV-NP Ag . Acredita-se que apesar da resposta potenciométrica ser semelhante ao eletrodo de prata Bulk, a presença do passivante faz com que o tempo de estabilização do potencial seja maior, quando comparado ao tempo para o eletrodo Bulk, no mesmo volume de titulante. O tempo de estabilização para a realização das duas titulações foi mantido constante. Porém, é provável que a estabilização do ECV-NP Ag necessite de um tempo maior e, assim, uma pequena diferença de potencial é observada. Apesar disso, o ECV-NP Ag mostrou uma boa resposta potenciométrica, similar ao eletrodo de prata Bulk, demonstrando que a presença do passivante não interfere de forma significativa na resposta eletroquímica das NP Ag , o que ressalta sua potencialidade como modificador no desenvolvimento de sensores potenciométricos.

4.5 Preparação e caracterização voltamétrica de Eletrodos modificados com AgHCF

Considerando que o objetivo analítico principal do presente trabalho é utilizar EI modificados com NP Ag e que as condições para a formação dos óxidos de prata causam efeitos deletérios a esses dispositivos, buscou-se uma alternativa para superar tal empecilho. Assim, a formação de hexacianoferrato na superfície das nanopartículas de prata foi investigada, pois esse mediador redox pode atuar com bom desempenho em condições que não sejam prejudiciais ao material de eletrodo.

Primeiramente, a deposição do AgHCF foi realizada pelo método potenciodinâmico [102], que consistiu em sucessivas varreduras cíclicas de potencial sobre a superfície do ECV-NP Ag , em solução $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de KNO_3 contendo $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ferricianeto de potássio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$). Para a deposição foi escolhido uma faixa de potencial que varia de $-0,5 \text{ V}$ a $1,2 \text{ V}$,

onde foram realizados 50 ciclos com uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Posteriormente, o eletrodo foi retirado da solução, lavado e submetido à voltametria cíclica em solução contendo apenas o eletrólito suporte. As Figuras 26A e 26B mostram os resultados obtidos na etapa de formação e leitura, respectivamente.

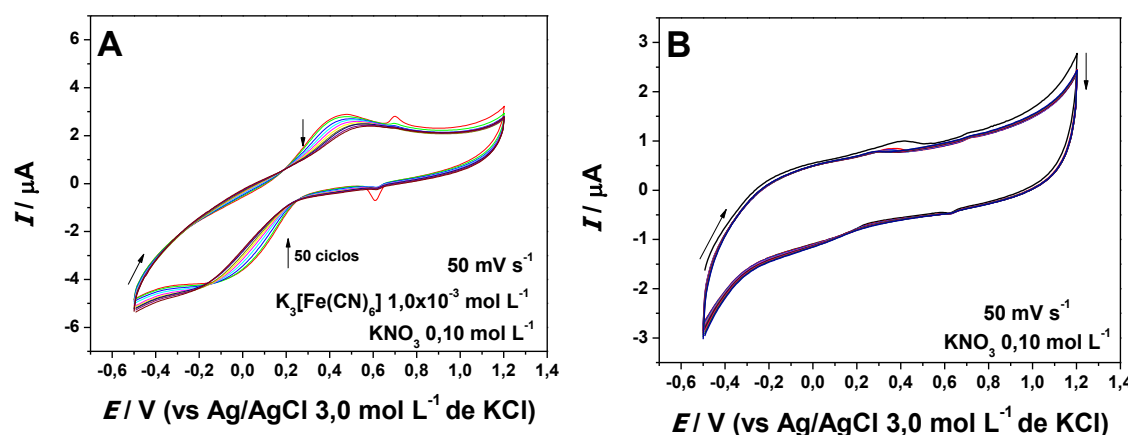


Figura 26 - A) Voltamogramas cíclicos obtidos para o ECV-NPAg, em solução contendo $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, durante a etapa de formação do AgHCF, B) Voltamogramas cíclicos obtidos para o mesmo eletrodo em solução de KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, após tratamento realizado em A.

Os voltamogramas cíclicos correspondentes a deposição do AgHCF podem ser observados na Figura 26 A, onde o perfil característico do processo de oxidação e redução do par ferro/ferri ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$) pode ser observado em todos os voltamogramas, $0,5 \text{ V}$ e $-0,2 \text{ V}$ respectivamente. Observa-se também, a presença de outro par redox entre $0,6 \text{ V}$ e $0,8 \text{ V}$, porém apenas no primeiro ciclo (vermelho). Esse processo redox é característico do AgHCF de acordo com o que é encontrado na literatura, evidenciando a princípio, a presença ou formação do AgHCF na superfície das NPAg.

Após o processo de deposição do AgHCF, o eletrodo utilizado foi lavado e submetido novamente a condições de voltametria cíclica, apenas na presença de KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, para observar se o AgHCF ficou incorporado na superfície eletródica. Entretanto, nenhum processo redox foi observado para o eletrodo submetido ao método potenciodinâmico de deposição, o que sugere que não houve a incorporação da AgHCF na superfície do eletrodo, como observado na Figura 26B. Embora o procedimento potenciodinâmico seja o

mais empregado para formação de outros análogos do Azul da Prússia [87], mais estudos são necessários para promover a formação do AgHCF. Assim, optou-se por empregar outra forma para a deposição do mediador.

Um procedimento galvanostático, para o processo de deposição do AgHCF sobre as NPAg, foi adotado [103]. O método consistiu na aplicação de uma corrente anódica fixa, durante um determinado tempo, sobre a superfície do ECV-NPAg, em solução de KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

O gráfico obtido para o processo de deposição é apresentado na Figura 27A e o perfil voltamétrico do eletrodo modificado com AgHCF, obtido em eletrólito suporte, é mostrado na Figura 27B.

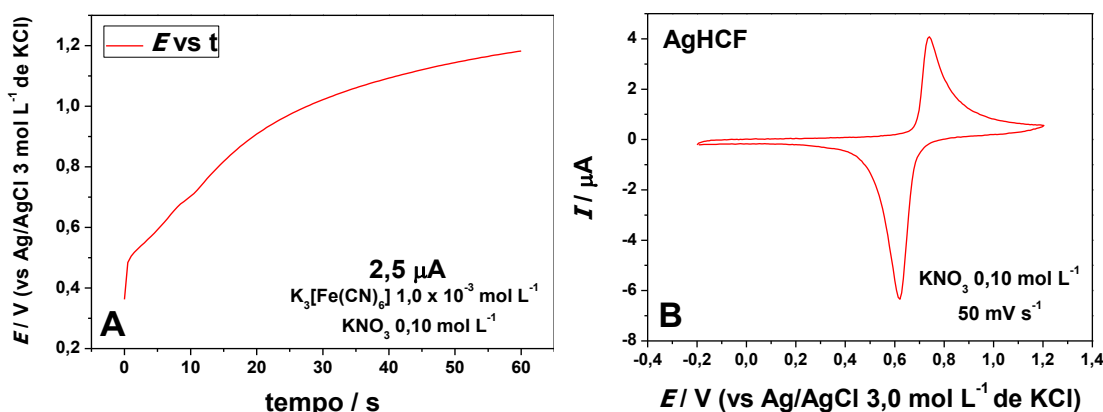


Figura 27 - A) Curva de E vs tempo referente a formação do AgHCF sobre as NPAg em solução contendo $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, B) Voltamograma cíclico obtido para o eletrodo modificado com AgHCF, através do método galvanostático, em solução de KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

Na Figura 27A é observado o desenvolvimento de um potencial positivo necessário para oxidar as NPAg e formar o AgHCF. O perfil voltamétrico (Figura 27B), após a eletrodeposição do AgHCF é condizente com resultados encontrados na literatura [114, 115]. O comportamento voltamétrico observado na Figura 27B exibe características semelhantes ao descrito para outros HCF, como os de níquel, cobre e cobalto [80]. Os HCF apresentam perfis voltamétricos bastantes característicos, com picos de corrente bem definidos e potencialidade para atuar como mediadores de reações redoxes para diferentes substâncias.

O método galvanostático apresentou resultados significativos no processo de deposição do AgHCF, sendo assim, foram realizados estudos para otimização dos parâmetros envolvidos durante a formação da AgHCF, como: valor da corrente aplicada, tempo de deposição e pH da solução de deposição ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ e KNO_3) e solução de leitura (KNO_3).

As correntes aplicadas a superfície do eletrodo, modificado com NPAg, foram estudadas com as seguintes intensidades: 1,0 μA - 1,5 μA - 2,0 μA - 2,5 μA - 3,0 μA e 4,0 μA . As Figuras 28A e 28B mostram a relação entre o valor de corrente aplicada com os perfis voltamétrico obtidos e intensidades de corrente de pico.

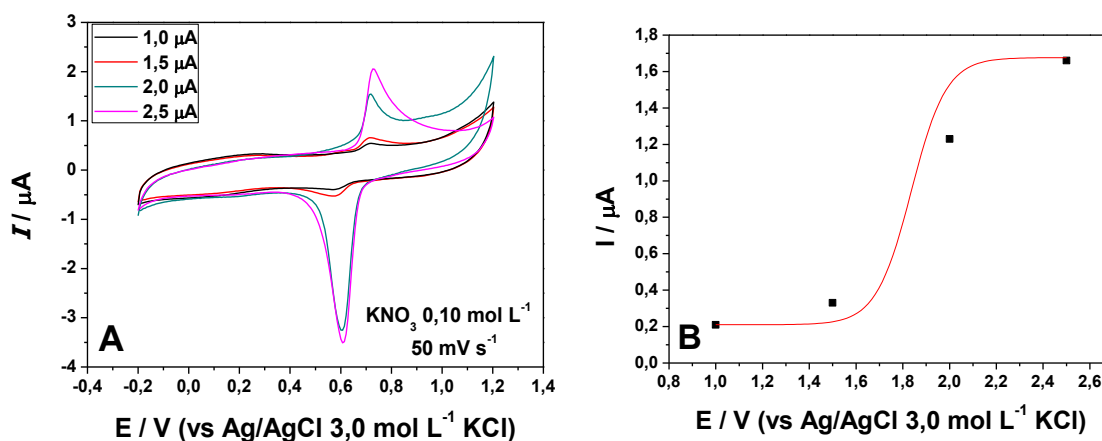


Figura 28 - A) Voltamogramas cíclicos obtidos para os eletrodos modificados com AgHCF, através do método galvanostático empregando diferentes intensidades de corrente, em solução de KNO_3 0,10 mol L⁻¹. B) Variação da corrente de pico anódica, em função da corrente utilizada no procedimento galvanostático.

Foi observada uma dependência direta entre a intensidade da corrente aplicada e o perfil voltamétrico obtido. A corrente que apresentou a melhor resposta foi de 2,5 μA , resultando em um perfil voltamétrico mais definido e de maior intensidade dos picos anódicos e catódicos. Eletrodos preparados empregando corrente de 3,0 μA apresentaram um perfil voltamétrico semelhante ao perfil do Azul da Prússia, não sendo possível uma comparação. Assim, uma corrente de 2,5 μA , no processo de formação do AgHCF, foi adotada para os demais estudos envolvendo o método galvanostático.

Após a otimização da corrente aplicada foi estudado o tempo de aplicação da corrente. Para isso, foram estudados tempos de 30 s, 60 s, 120 s,

300 s, 600 s e 1200 s. A Figura 29 mostra a variação de corrente anódica, em função do tempo de aplicação da corrente.

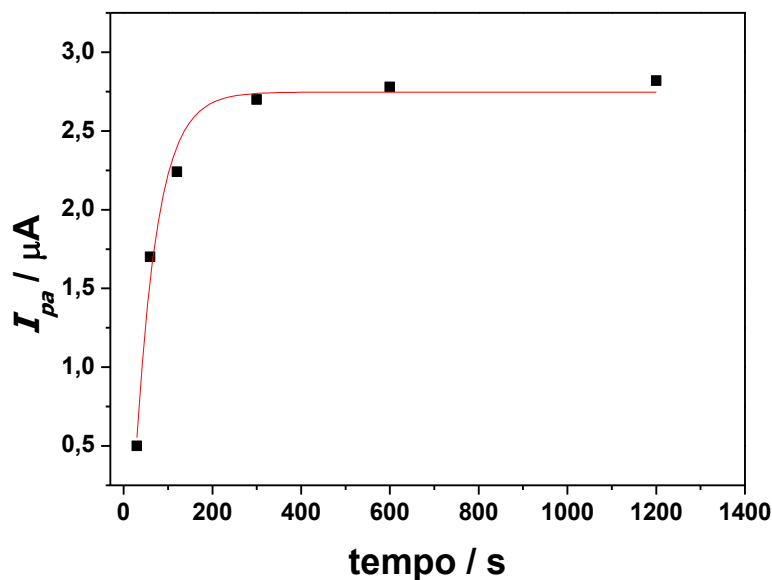


Figura 29 - Variação da corrente de pico anódica, em função do tempo utilizado no procedimento galvanostático.

Foi observado um aumento da resposta de corrente para tempos entre 30 s e 300 s. Entretanto, a partir de 60 s existe uma perda na resolução dos picos e um aumento significativo da corrente capacitiva. O aumento da corrente dos picos deve-se a uma maior quantidade de modificador depositado sobre a superfície das NPAg. Para tempos mais longos (acima de 300s), é verificada uma aparente saturação da superfície das NPAg. O aumento da corrente de fundo deve-se ao maior tempo de polarização do eletrodo, o que acarreta uma maior quantidade de cargas formadas na superfície eletródica. Para uma melhor visualização, a Figura 30 mostra os voltamogramas obtidos para eletrodos submetidos a 60 s e 300 s de eletrólise, para formação do AgHCF.

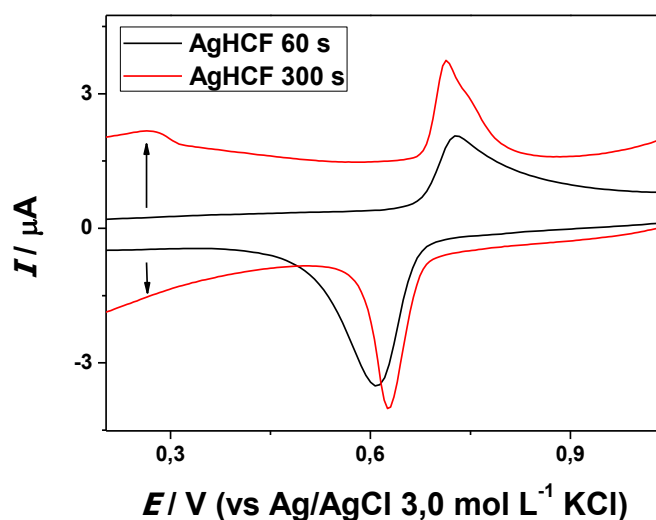


Figura 30 - Voltamogramas cíclicos obtidos em solução $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de KNO_3 , para eletrodos submetidos à deposição de AgHCF, com tempos de 60 s e 300 s.

Devido ao aumento da corrente capacitiva e a perda de resolução do voltamograma, optou-se por utilizar tempos menores para a deposição do AgHCF, uma vez que voltamogramas muito capacitivos podem influenciar a sensibilidade. Assim, o tempo de deposição escolhido foi de 60 s.

O efeito do pH da solução de preparação e de leitura foi investigado, para valores entre 3,0 e 8,0. A variação da corrente de pico anódica pode ser observada na Figura 31.

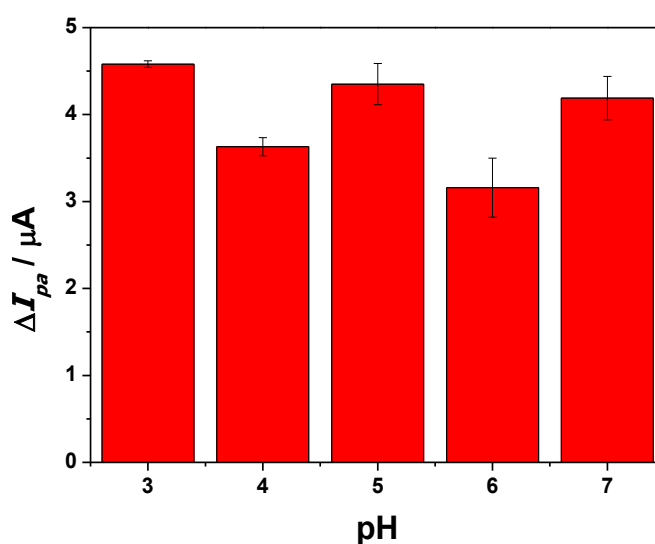


Figura 31 - Variação da intensidade do pico de corrente anódica, em função dos diferentes valores de pH utilizados para a deposição do AgHCF.

Para valores de pH menores que 3,0, não houve a obtenção de um perfil voltamétrico adequado. Em pH acima de 7,0, a formação do AgHCF não é estável, pois pode ocorrer a sua solubilização e lixiviação. Dentro do intervalo avaliado, não foi verificada grande variação, sendo a melhor resposta observada para pH 3,0 como observado na Figura 31. Assim, o processo de deposição do AgHCF apresenta uma robustez com relação a variação do pH. Os parâmetros investigados, o intervalo avaliado e os melhores valores são observados na Tabela 2.

TABELA 2 - PARÂMETROS PARA DEPOSIÇÃO AGHCF ATRAVÉS DO MÉTODO GALVANOSTÁTICO.

| Parâmetro | Valores Estudados | Valor Escolhido |
|----------------------------|-------------------|-----------------|
| Corrente (μA) | 1,0 – 4,0 | 2,5 |
| Tempo (s) | 15 - 1200 | 60 |
| pH (cresc. e leitura) | 2,0 – 8,0 | 3,0 |

Com o intuito de verificar a eficiência do procedimento galvanostático na preparação do AgHCF, outros eletrodos foram avaliados como substratos (ITO e EI), sem modificação e modificados com as NPAg. Todos os estudos foram realizados em solução de KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte, a uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 32A e 32B.

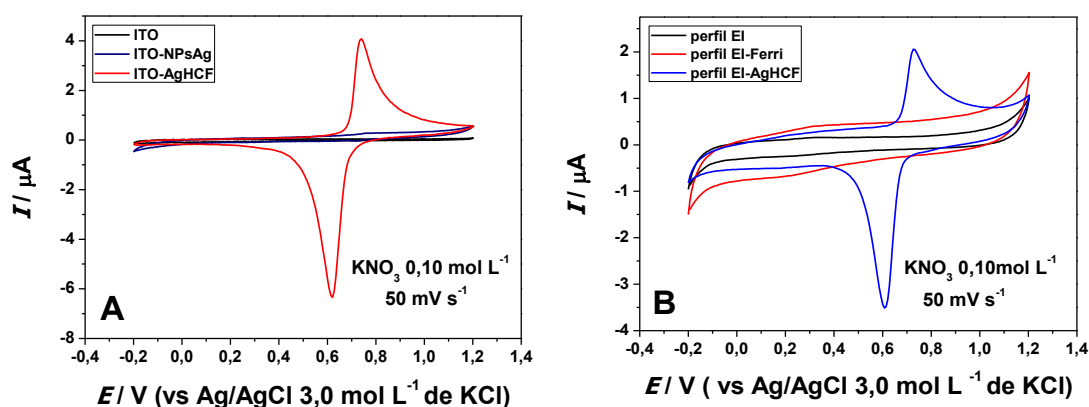


Figura 32 - Voltamogramas cíclicos obtidos em meio de KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, a 50 mV s^{-1} , para o substrato sem modificação e modificado com NPAg, antes e após a formação do AgHCF, A) ITO, e B) EI.

O processo redox característico para o AgHCF foi verificado apenas para eletrodos contendo as NPAg submetidos a etapa de deposição, não havendo presença ou formação do HCF nos eletrodos não modificados (EI ou ITO) submetidos a etapa de formação do AgHCF.

Comparando o perfil voltamétrico apresentados nas Figuras 32A e 32B, pode-se verificar que os sinais característicos do AgHCF são observados somente para os eletrodos modificados com NPAg, submetidos ao processo de eletrodeposição pelo método galvanostático, tanto sobre a superfície de ITO, quanto para a superfície do EI. Isso comprova a evidência de que o perfil observado realmente é do processo de oxi-redução do AgHCF, formado sobre as NPAg. Os resultados demonstram que o procedimento é eficiente para diferentes eletrodos base, podendo ser empregado para ECV, EI e ITO, sem grandes variações de resposta voltamétrica.

Visando verificar a eficiência do procedimento na formação e na estabilidade da medida voltamétrica, diferentes eletrodos impressos foram modificados e submetidos à medidas de voltametria cíclica. Os gráficos que representam a repetibilidade e reprodutibilidade dos processos obtidos para o AgHCF estão mostrados nas Figuras 33A e 33B, respectivamente.

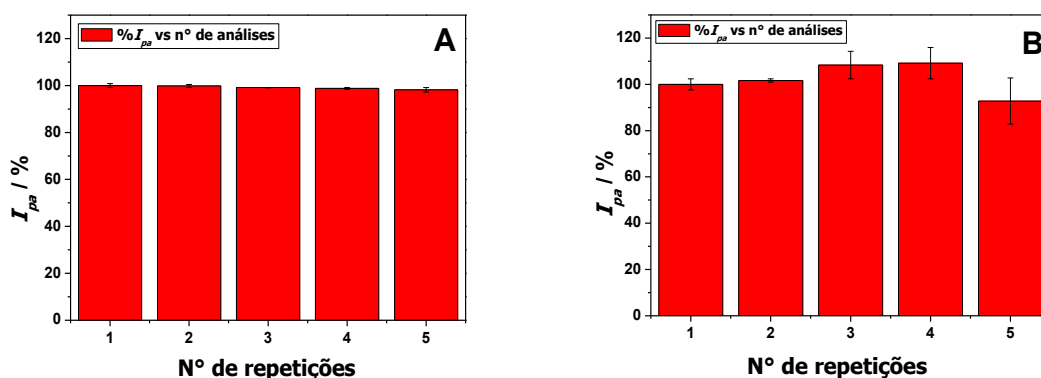


Figura 33 - A) Gráfico em colunas da repetibilidade do perfil voltamétrico do AgHCF para o mesmo eletrodo; B) Gráfico em colunas da reprodutibilidade do perfil voltamétrico do EI-AgHCF para diferentes eletrodos.

O perfil do AgHCF apresentou boa estabilidade após várias medidas, mostrando que a resposta voltamétrica é repetitiva. Além disso, a reprodutibilidade na intensidade de corrente de pico anódica entre diferentes

eletrodos foi satisfatória, uma vez que as intensidades de corrente dos picos apresentaram pequena diferença.

Do ponto de vista eletroquímico, o processo de oxi-redução observado para o eletrodo modificado com AgHCF é permitido pelo fato de haver o fenômeno de contrabalanceamento de carga dentro da estrutura do AgHCF. O arranjo é composto por interstícios, os quais apresentam um íon positivo em seu interior. Durante reações de oxi-redução, ocorre a intercalação/extração do cátion para contrabalancear a carga global do complexo. Na maioria dos MHCF, o cátion mais utilizado é o K^+ , por possuir tamanho e mobilidade adequados à estrutura do hexacianoferrato. Outros cátions podem ser utilizados no processo de intercalação sem alterar a estrutura do complexo. Dentro desse contexto, diversos estudos são relatados visando a investigação do deslocamento de cátions (e ânions, em alguns HCF), durante a compensação de carga dos filmes de hexacianoferratos metálicos.

A estrutura do AgHCF é semelhante ao Azul da Prússia ($Fe^{(III)}_4[Fe^{(II)}(CN)_6]_3$), diferenciando-se apenas pelo átomo de prata ligada ao nitrogênio do grupo ciano ($M^{(I)}Ag^{(I)}_3 [Fe^{(II)}(CN)_6]_3$). Na estrutura do complexo, existe um íon monovalente ($M^{(I)}$) que intercala no seu interior contrabalanceando a carga global e favorecendo reações de redução e oxidação. Resultados encontrados na literatura [76, 116] sugerem que há duas diferentes formas estruturais de AgHCF, diferenciando-se apenas no cátion metálico presente na estrutura. Os cátions K^+ e Ag^+ são os que intercalam preferencialmente na estrutura do AgHCF. Assim, para certificar a composição mais adequada, foram realizadas voltametrias cíclicas com um eletrodo modificado com AgHCF na presença de íons K^+ (KNO_3 0,10 mol L^{-1}) e Ag^+ ($AgNO_3$ 0,01 mol L^{-1}). Os voltamogramas cíclicos obtidos são mostrados na Figura 34.

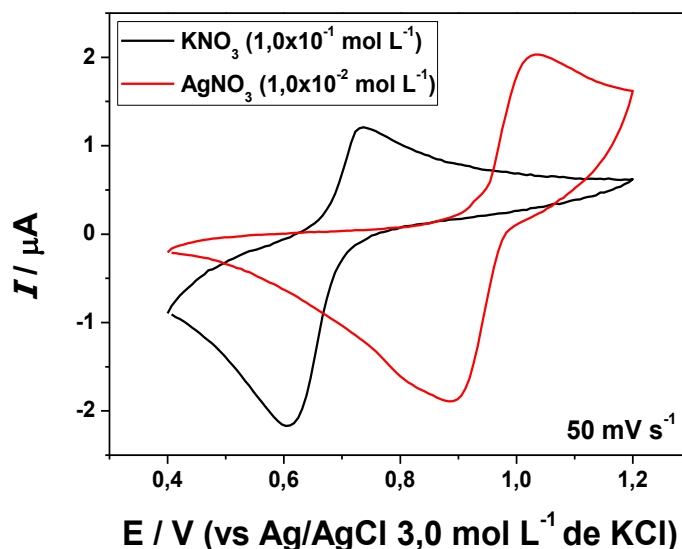
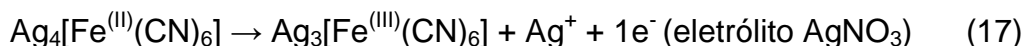
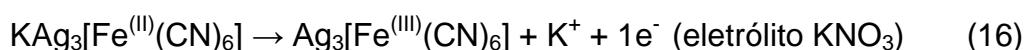


Figura 34 - Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo EI-AgHCF na presença de KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e AgNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$.

É observada uma diferença nos perfis voltamétricos obtidos para o eletrodo modificado com AgHCF, nas duas soluções utilizadas.. O perfil voltamétrico na presença de íons Ag^+ apresenta-se deslocado para potenciais mais positivos, em comparação ao obtido na presença de íons K^+ . É provável que os íons Ag^+ apresentem uma maior interação com a estrutura do AgHCF [117]. A diferença dos perfis voltamétricos sugerem a presença de duas prováveis estruturas do AgHCF, confirmando os relatos da literatura [76, 116]. As equações (16) e (17) representam as reações redox do AgHCF:



As reações apresentadas acima são atribuídas a mesma estrutura de ferricianeto, diferenciando apenas no cátion que intercala nos interstícios existentes na estrutura do AgHCF. Assim, é possível concluir que a intercalação de íons K^+ e Ag^+ pode ocorrer, dependendo da presença dos cátions em solução.

Um estudo empregando voltametria cíclica foi realizado em diferentes velocidades de varredura, utilizando o eletrodo modificado com AgHCF, em uma solução de KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. Para a realização deste estudo, a velocidade de varredura foi variada de 10 mV s^{-1} a 200 mV s^{-1} . Os

voltamogramas cíclicos obtidos para este estudo e as curvas de correlação entre as correntes de pico e a raiz quadrada da velocidade de varredura podem ser observadas nas Figuras 35A e 35B, respectivamente.

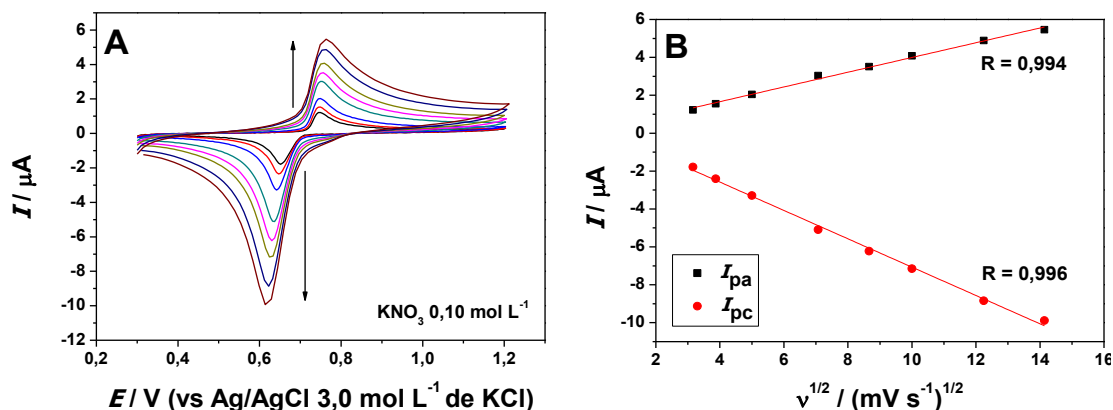


Figura 35 - A) Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes velocidades de varredura do eletrodo EI-AgHCF, em solução de KNO_3 0,10 mol L⁻¹, B) Curvas de correlação entre as correntes de pico anódicas (I_{pa}) e catódicas (I_{pc}), em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$).

É possível observar um aumento linear entre as correntes de pico, anódica e catódica, em função da velocidade de varredura. Esses resultados sugerem que o processo de intercalação/extração dos cátions é controlado pela difusão dos mesmos no interior da estrutura.

Utilizando o voltamograma cíclico obtido a 10 mV s⁻¹, foi possível fazer uma estimativa da quantidade aparente de material de modificador na superfície do eletrodo. O eixo de potencial do voltamograma cíclico foi normalizado para tempo, utilizando a velocidade de varredura, como pode ser observado na Figura 36.

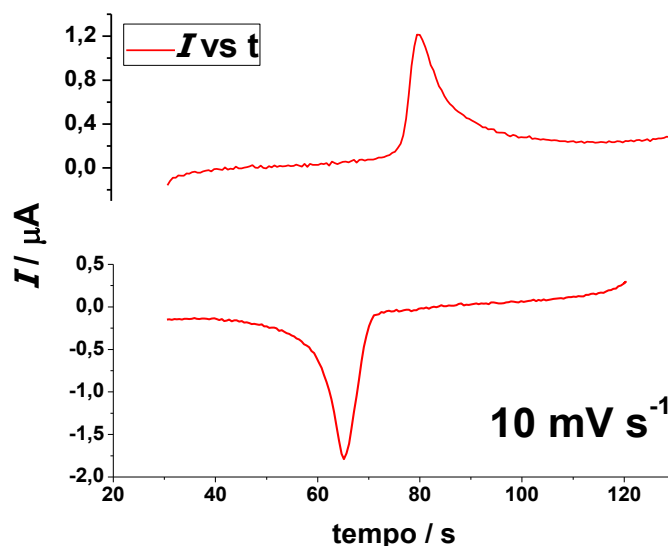
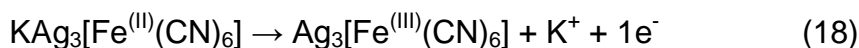


Figura 36 - Voltamogramas cíclicos normalizados de I_{pa} e I_{pc} em função do tempo.

As áreas integradas sob os sinais de oxidação e redução fornecem a quantidade de carga envolvida em cada processo (Q_{Ipa} e Q_{Ipc}). Com os valores de carga, estima-se a carga média (Q_m) entre os dois processos ($Q_m = 1,75 \times 10^{-5}$ C). Assim, é possível fazer uma estimativa da quantidade de $AgHCF$ presente na superfície eletródica (Γ_{AgHCF}). Considerando a constante de Faraday ($F = 96485,34$ C mol $^{-1}$) e a área geométrica do eletrodo ($A = 0,031$ cm 2), foi encontrada uma Γ_{AgHCF} de $5,85 \times 10^{-9}$ mol cm $^{-2}$. A quantidade aparente de prata incorporada à superfície pode ser obtida com base na estequiometria do complexo, representada na equação (18):



Um valor de $1,75 \times 10^{-8}$ mol cm $^{-2}$ de prata, na superfície do eletrodo modificado, foi calculado. O valor estimado, a partir do voltamograma, mostra uma quantidade aparente de NPAg próxima ao valor esperado de $1,77 \times 10^{-8}$ mol cm $^{-2}$, considerando a quantidade de NPAg presentes na dispersão utilizada para a modificação. Este valor é calculado com base na massa inicial de Ag^+ adicionada na síntese das NPAg, considerando que todo íon Ag^+ é reduzido a Ag^0 em um volume total de dispersão de 10 mL.

4.6 Avaliação da potencialidade analítica dos Eletrodos modificados com AgHCF

Depois de estudados os aspectos envolvidos nas condições de formação do AgHCF, a etapa seguinte consistiu em investigar a potencialidade analítica do eletrodo modificado como sensor eletroquímico para a isoniazida (INZ). Inicialmente, foram obtidos voltamogramas cíclicos com os eletrodos: EI não modificado (—) e o EI-AgHCF (—) em solução de KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, na ausência e na presença de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de INZ. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 37.

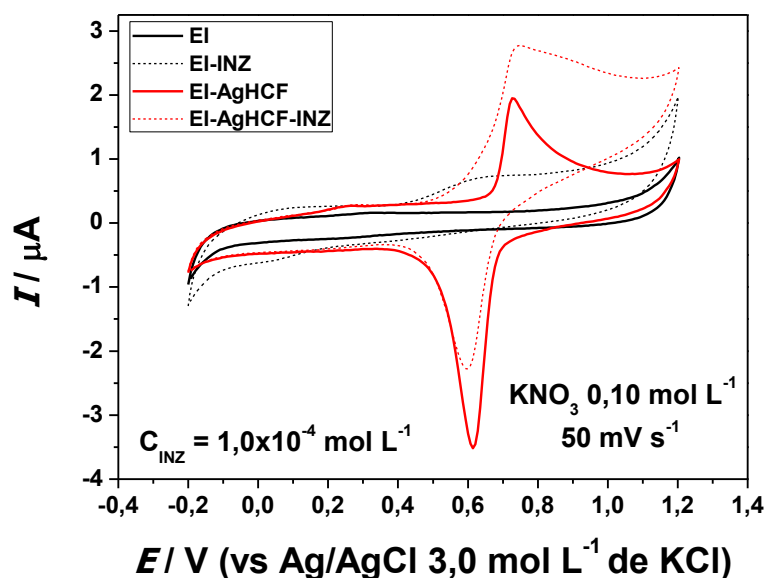


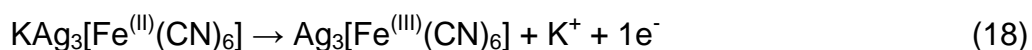
Figura 37 - Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ para o EI-AgHCF, na ausência e na presença de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de isoniazida, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Observando os resultados apresentados na Figura 37, é possível verificar um pico de corrente a partir do potencial de $0,60 \text{ V}$ para EI não modificado na presença de INZ. O processo, provavelmente referente à possível oxidação da INZ, apresenta uma baixa magnitude de corrente ($3,8 \times 10^{-7} \text{ A}$).

Os voltamogramas obtidos para o EI-AgHCF apresentam uma diferença significativa no perfil voltamétrico, quando comparados os resultados na ausência e na presença de INZ. Na ausência de INZ, são observados os sinais relatados anteriormente para o processo redox do AgHCF (equação 18). Na

presença do analito, é observado um aumento da intensidade de corrente anódica (0,70 V) de $8,3 \times 10^{-7}$ A, valor maior que o dobro comparado ao EI não modificado, e na varredura reversa, é possível observar uma diminuição da intensidade de corrente para o sinal catódico em 0,64 V.

O aumento na intensidade da corrente de pico anódica sugere a ocorrência de um mecanismo relacionando uma reação química acoplada do tipo Eletroquímico-Químico (EC'), ou seja, o par redox $\text{KAg}_3[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]/\text{Ag}_3[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]$ promove a oxidação química da INZ (19). Esse tipo de resposta é bem estabelecida na literatura [76]. Na etapa eletroquímica (E) ocorre a formação do $\text{Ag}_3[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]$, o qual reage quimicamente com a INZ, em uma etapa química (C), regenerando o $\text{KAg}_3[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]$.



Como o eletrodo está polarizado em uma região de potencial suficiente para promover a re-oxidação dessa espécie, o ciclo gera um incremento de corrente na corrente de pico anódica. A diminuição da corrente de pico catódica é devida ao consumo químico parcial do $\text{Ag}_3[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]$ pelo analito. A proposta de funcionamento para o dispositivo pode ser representada pela Figura 38.

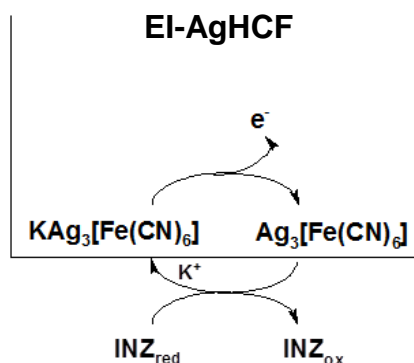


Figura 38 - Mecanismo proposto para o funcionamento do EI-AgHCF na presença de INZ.

Considerando o ganho de corrente observado, é possível concluir que o dispositivo apresenta potencialidade para a determinação de INZ. Nesse sentido, mais estudos foram realizados, visando à determinação de INZ. Para isso, foram obtidos voltamogramas cíclicos para soluções contendo diferentes concentrações de INZ, os quais são mostrados na Figura 39.

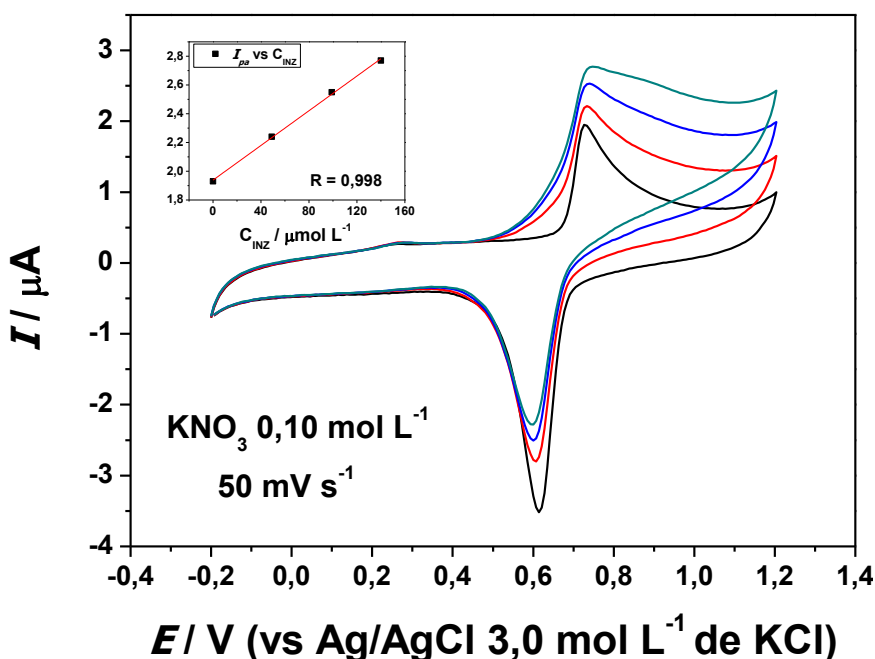


Figura 39 - Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de KNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, para o EI-AgHCF, em diferentes concentrações de INZ: (—) Ausência de INZ, $4,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (—), $9,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (—) e $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (—), $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Curva Analítica em detalhe.

Analisando os resultados da Figura 39, observa-se um aumento linear da intensidade de corrente anódica em função da concentração de INZ (detalhe). A curva de correlação obtida para o estudo apresenta uma boa linearidade, $R = 0,998$, e uma sensibilidade de $6,03 \times 10^{-3} \mu A \text{ L mol}^{-1}$, demonstrando, assim, a possibilidade do emprego do EI-AgHCF como sensor eletroquímico para a determinação de INZ. Embora o eletrodo tenha apresentado potencialidade na forma convencional, optou-se por aplicar o dispositivo como um detector amperométrico para INZ, em um sistema de análise por injeção em fluxo (FIA). A escolha é fundamentada no fato dos sistemas FIA apresentarem diversas características convenientes, como baixo

tempo de análise, ótima precisão, baixo consumo de reagentes e alta frequência analítica.

4.7 Determinação amperométrica de INZ empregando um sistema de análise por injeção em fluxo (FIA)

4.7.1 Otimização dos parâmetros empregados na determinação por FIA

Estudos de otimização dos parâmetros aplicados ao sistema FIA foram realizados visando aplicar o eletrodo proposto como um detector amperométrico para determinação de INZ. A influência de parâmetros experimentais pertinentes, como o potencial aplicado ao eletrodo, o volume da alça de amostragem e a vazão da solução transportadora, foi investigada. Para todos os estudos foram utilizadas soluções contendo concentração de INZ de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Inicialmente foi realizado o estudo do efeito do potencial aplicado, para tal, diferentes valores de potenciais foram aplicados ao eletrodo de trabalho. Nesse aspecto, cabe salientar que todos os estudos apresentados até o momento foram realizados com um eletrodo de referência externo de Ag/AgCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl. Com o objetivo de empregar o conjunto de eletrodos impressos como de um arranjo de eletrodos em um mesmo dispositivo, foi investigado o potencial do pseudo eletrodo de referência de carbono.

O termo “pseudo eletrodo de referência” está relacionado ao fato do potencial desenvolvido por este eletrodo não ser “constante” como os eletrodos de referência convencionais. Eletrodos de referência convencionais apresentam um sistema fechado, com concentração interna constante, já o eletrodo de referência de carbono impresso não possui solução interna confinada, sendo a variação de potencial dependente da solução externa empregada. Assim, há a necessidade de avaliar a diferença entre os potenciais desenvolvidos para o eletrodo impresso e um eletrodo de referência convencional de Ag/AgCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl. Para isso, foi realizado um estudo

comparando o perfil voltamétrico obtido para o mesmo eletrodo utilizando diferentes eletrodos de referência. A Figura 40A mostra os voltamogramas cíclicos obtidos para os dois diferentes eletrodos de referência empregados.

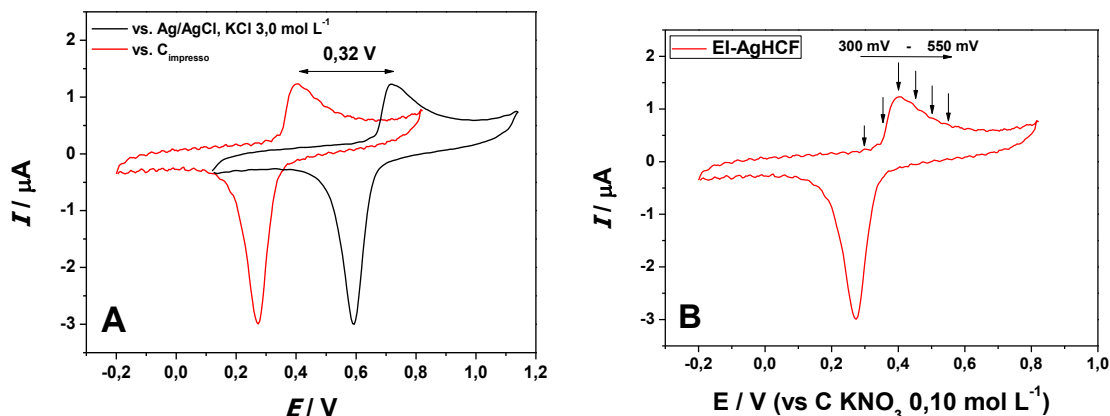


Figura 40 - A) Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de KNO_3 para um EI-AgHCF utilizando diferentes eletrodos de referência; B) Voltamograma cíclico ilustrando os valores de potencial aplicado. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Observando a Figura 40A é possível verificar que o perfil voltamétrico utilizando o eletrodo de referência a base de carbono impresso é deslocado 320 mV para potenciais menos positivos em comparação ao eletrodo de referência externo de Ag/AgCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ KCl. Assim, os estudos referentes à otimização dos potenciais aplicados foram realizados com base no perfil voltamétrico utilizando o eletrodo de referência do conjunto de eletrodos impressos.

A Figura 40B ilustra a região de potenciais avaliados na otimização do detector. Esses valores de potenciais foram escolhidos com base no pico anódico, pois é onde a reação de oxidação da INZ é mediada. Os valores de potenciais de 300, 350, 450, 500 e 550 mV (vs. $\text{C}_{\text{impresso}}$) foram investigados, mantendo-se os demais parâmetros envolvidos, como volume da alça de amostragem, vazão aplicada e concentração de INZ em $200 \mu\text{L}$, $2,9 \text{ mL min}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Os sinais transientes obtidos e o efeito sobre a corrente podem ser observados nas Figuras 41A e 41B, respectivamente.

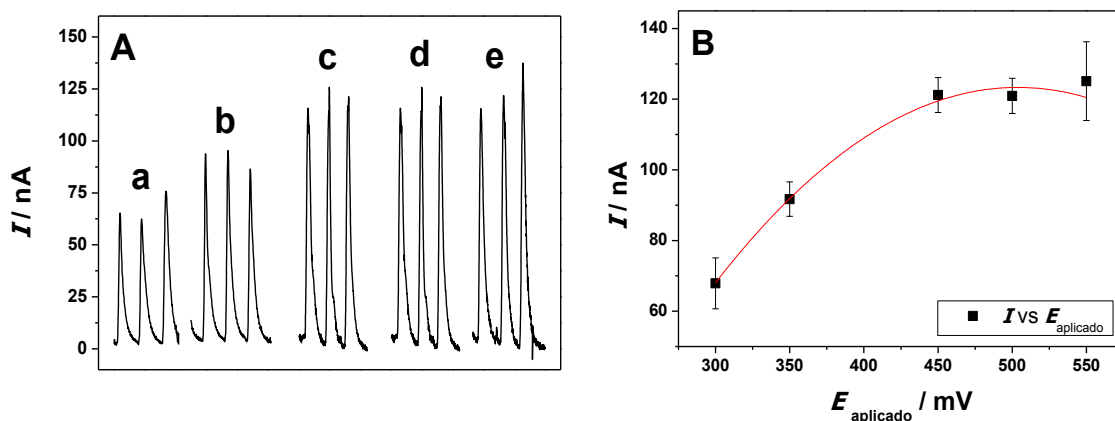


Figura 41 - A) Sinais transientes obtidos para diferentes valores de potencial: 300 mV (a), 350 mV (b), 450 mV (c), 500 mV (d) e 550 mV (e); aplicados para três injeções consecutivas de INZ e; B) Intensidade da média das correntes e seus respectivos de desvios em função do potencial aplicado. $C_{\text{INZ}} = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, vazão de $2,9 \text{ mL min}^{-1}$ e volume injetado de $200 \text{ }\mu\text{L}$.

Com base nos resultados obtidos é possível observar, para o intervalo entre 300 e 450 mV, que a intensidade dos sinais transientes apresenta um aumento significativo à medida que potenciais mais positivos são aplicados, provavelmente devido a uma oxidação mais efetiva do mediador na superfície do eletrodo. Para valores de potenciais mais elevados, acima de 450 mV, observa-se a estabilização do valor do transiente. Esse comportamento provavelmente é atribuído à reposição da INZ na forma reduzida na superfície do eletrodo.

Com base nos resultados obtidos optou-se por trabalhar com um potencial aplicado de 450 mV (vs. C_{impresso}). Embora exista um ganho de corrente em potenciais mais positivos, como 500 e 550 mV, esse incremento não é tão significativo. Além disso, potenciais mais elevados diminuem a seletividade do método. Para potenciais maiores, a oxidação do solvente pode ocorrer e influenciar a linha base do sinal obtido.

Após a escolha do potencial aplicado ao eletrodo de trabalho foi realizado um estudo para avaliar o efeito do volume de alça de amostragem sobre a resposta amperométrica do detector. Para esse estudo foram fixados os seguintes parâmetros: potencial aplicado (valor já otimizado), vazão empregada e concentração de INZ, sendo 450 mV, $2,9 \text{ mL min}^{-1}$, e $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Foram estudados volumes de alça de amostragem de 25, 50, 100, 200 e 300 μL através de sucessivas injeções em triplicatas para

cada volume empregado. Os sinais transientes obtidos e o perfil da resposta em função do parâmetro avaliado são apresentados na Figura 42.

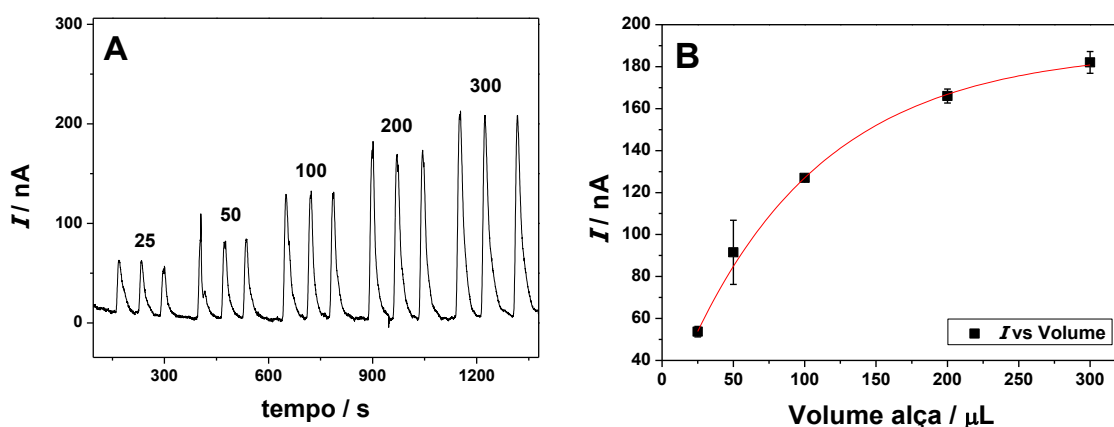


Figura 42 - A) Sinais transientes obtidos para diferentes valores de volume da alça de amostragem para três injeções consecutivas de INZ e; B) Variação do sinal transiente de corrente em função dos diferentes volumes de alça de amostragem. $C_{\text{INZ}} = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, vazão de $2,9 \text{ mL min}^{-1}$ e potencial aplicado $+450 \text{ mV}$.

Os sinais transientes e os respectivos valores de desvios padrão em função do volume de alça de amostragem mostram um aumento da intensidade do sinal com o aumento do volume da alça de amostragem. Os maiores volumes de alça de amostragem apresentam a maior intensidade de corrente, provavelmente devido a uma menor dispersão da amostra durante o percurso analítico, isso faz com que uma zona de amostragem mais concentrada de INZ chegue até a superfície do detector. Com base nos resultados obtidos, optou-se por utilizar uma alça de amostragem de $200 \mu\text{L}$. O aumento observado para volumes maiores não justifica o uso de alças acima de $200 \mu\text{L}$. Assim, a partir de um volume crítico, qualquer concentração injetada vai responder com intensidades de correntes muito semelhantes, não havendo uma relação coerente entre concentração de INZ e intensidade de corrente. Esse efeito é semelhante à saturação da superfície no eletrodo de trabalho quando se utilizam volumes maiores de alça de amostragem, já que em volumes elevados a amostra não é dispersa o suficiente, ou seja, a amostra não é diluída no eletrólito utilizado. Como a amostra não sofre diluição o sinal obtido corresponde a real concentração injetada, e esse efeito foi verificado para valores superiores a $200 \mu\text{L}$.

Para os estudos de otimização da vazão da solução transportadora, foram utilizados os valores de 1,5, 2,0, 2,9 e 3,7 mL min⁻¹ mantendo-se fixados os parâmetros já estudados, como potencial aplicado (450 mV) e volume da alça de amostragem (200 µL). Os sinais transientes obtidos no estudo de da vazão e o perfil do comportamento de resposta são mostrados na Figura 43.

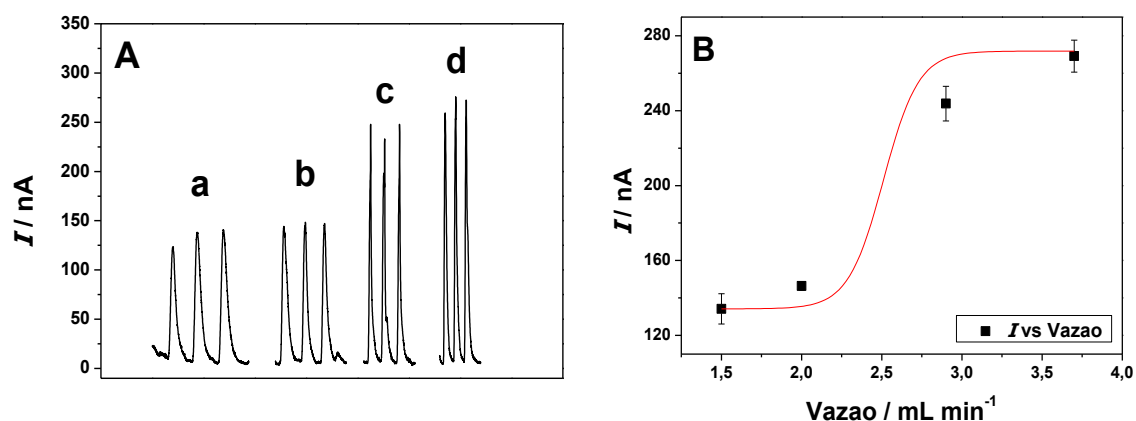


Figura 43 - A) Sinais transientes obtidos para diferentes valores de vazão: 1,5 mL min⁻¹ (a), 2,0 mL min⁻¹ (b), 2,9 mL min⁻¹ (c) e 3,7 mL min⁻¹ (d); para três injeções consecutivas de INZ e; B) Variação do transiente de corrente em função das diferentes vazões utilizadas. C_{INZ} = 1,0x10⁻⁴ mol L⁻¹, potencial aplicado +450 mV e volume injetado de 200 µL.

Observando os resultados das Figuras 43A e 43B verificou-se um aumento da corrente do sinal transiente à medida que são empregadas vazões mais elevadas. O aumento da vazão promove uma melhora no transporte de massa, ou seja, aumenta a velocidade de reposição de INZ, aumentando a eficiência do transporte de massa até a superfície eletródica, o que promove uma maior conversão do analito e aumenta a intensidade do sinal.

Além do aumento do sinal transiente também se verificou um estreitamento do mesmo. Esse comportamento ocorre devido ao menor tempo de confinamento da INZ no detector, com isso um tempo de limpeza menor é necessário, influenciando diretamente na frequência de amostragem. Com base na maior intensidade de corrente e um sinal transiente estreito foi adotado o valor de 2,9 mL min⁻¹ como valor de vazão adequado. Embora o valor escolhido proporcione uma menor intensidade de corrente que a vazão de 3,7 mL min⁻¹, este valor não foi escolhido, pois gera um aumento da pressão interna do sistema o que provoca problemas de vazamentos nas conexões da

tubulação e dificulta as análises. Os valores dos parâmetros estudados e os otimizados são observados na Tabela 3.

TABELA 3 - VALORES COM OS VALORES DOS PARÂMETROS E OTIMIZADOS

| Parâmetro | Estudado | Otimizado |
|---|-----------|-----------|
| Potencial (mV vs. C_{impresso}) | 300 – 550 | 450 |
| Alça de amostragem (μL) | 25 – 300 | 200 |
| Vazão (mL min^{-1}) | 1,5 – 3,7 | 2,9 |

Após o estudo de otimização dos parâmetros FIA, foi obtida uma curva analítica a fim de verificar a potencialidade analítica do dispositivo proposto. Empregando o sistema nas condições otimizadas foram realizadas injeções em triplicatas de concentrações (sentido crescente e decrescente) de INZ para valores entre $5,0 \times 10^{-6}$ e $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Nesses estudos, foram avaliados os eletrodos impressos modificados (EI-AgHCF) e não modificados (EI) para comparação. Os sinais transientes obtidos para o eletrodo modificado são mostrados na Figura 44.

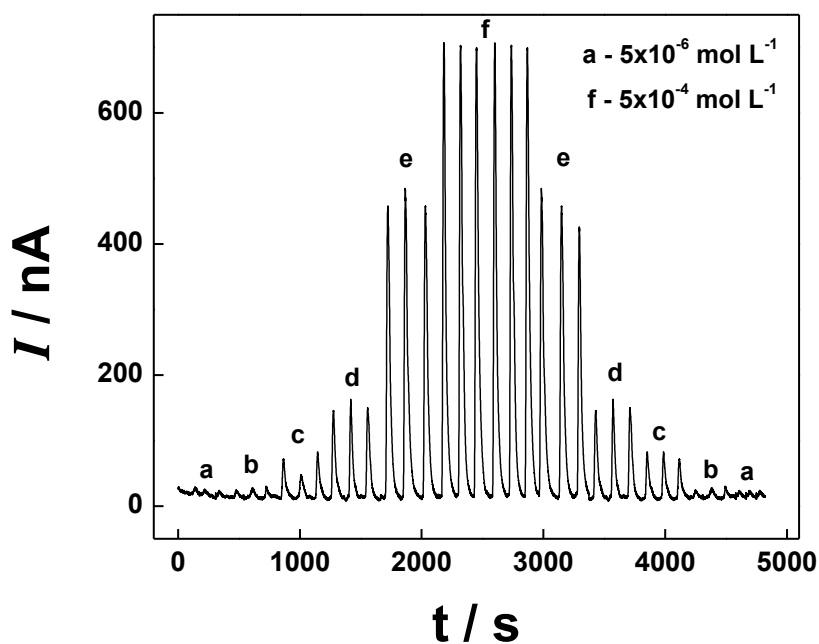


Figura 44 - Sinais transientes obtidos para injeção de diferentes concentrações de INZ nas condições otimizadas. C_{INZ} = (a) $5,0 \times 10^{-6}$, (b) $1,0 \times 10^{-5}$, (c) $5,0 \times 10^{-5}$, (d) $1,0 \times 10^{-4}$, (e) $3,0 \times 10^{-4}$ e (f) $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Os sinais transientes para a determinação de INZ utilizando o EI-AgHCF como detector amperométrico apresentaram boa repetibilidade para as diferentes concentrações de INZ e não foi observado nenhum efeito de memória para as injeções decrescentes. A média das intensidades de corrente obtida foi correlacionada com as respectivas concentrações para a obtenção de uma curva analítica, apresentada na Figura 45.

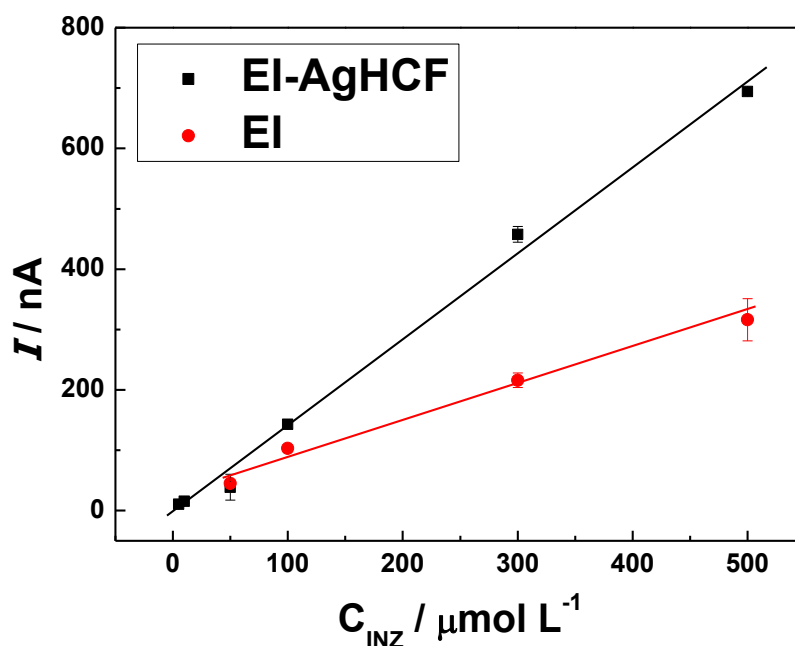


Figura 45 - Curvas Analíticas obtidas com diferentes concentrações de INZ utilizando um sistema FIA para os EI não modificado e EI-AgHCF.

Foi observado um aumento linear da corrente em função do aumento da concentração de INZ para o EI não modificado no intervalo de concentração entre 50 e 500 μmol L⁻¹ e uma sensibilidade de $6,2 \times 10^{-4} \mu\text{A L mol}^{-1}$. O EI-AgHCF apresentou uma sensibilidade de $1,4 \times 10^{-3} \mu\text{A L mol}^{-1}$ e uma resposta linear entre 5,0 e 500 μmol L⁻¹. Ambos os estudos apresentam desvios relativamente baixos, o que pode ser atribuído a características dos sistemas FIA devido sua repetibilidade nas operações. Os parâmetros analíticos, tais como sensibilidade, limite de detecção (LOD) e faixa linear de trabalho (LDR) obtidos para os EI não modificado e EI-AgHCF são mostrados na Tabela 4.

TABELA 4: PARÂMETROS ANALÍTICOS OBTIDOS NA CALIBRAÇÃO DOS EI NÃO MODIFICADO (EINM) E EI-AGHCF.

| | EINM | EI-AgHCF |
|--|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Sensibilidade ($\mu\text{A L mol}^{-1}$) | $6,2 \times 10^{-4}$ | $1,4 \times 10^{-3}$ |
| LOD (mol L^{-1}) | $1,0 \times 10^{-5}$ | $2,6 \times 10^{-6}$ |
| LDR (mol L^{-1}) | $5 \times 10^{-5} - 5 \times 10^{-4}$ | $5 \times 10^{-6} - 5 \times 10^{-4}$ |
| Frequência de amostragem (injeções / h) | 24 | 24 |

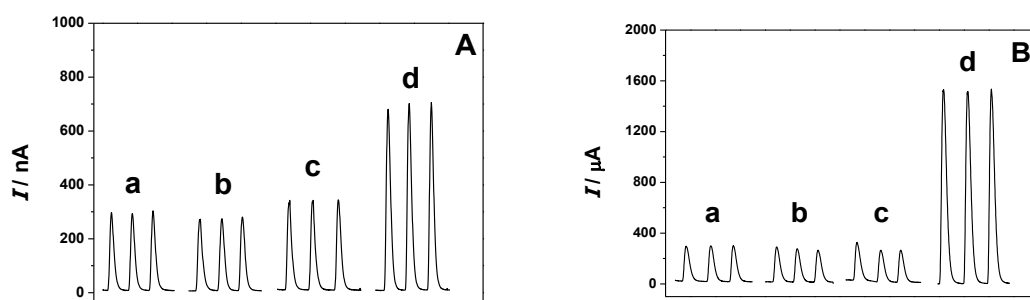
Comparando os dois conjuntos de resultados pode-se observar uma maior sensibilidade para o EI-AgHCF, um menor limite de detecção (LOD) e uma maior faixa linear de trabalho (LDR) em comparação aos resultados obtidos para o EI sem modificação. Além de apresentar uma frequência de amostragem de 24 injeções por hora, um número significativo em comparação às análises realizadas utilizando o procedimento convencional. O limite de detecção (LOD) consiste na menor quantidade de analito que é possível quantificar diferenciando o ruído da análise. O limite de detecção foi calculado como $\text{LOD} = 3S / b$, onde S é o desvio padrão do branco (sinal de corrente sem a adição do analito), e b a inclinação da reta curva de quantificação, mais precisamente a sensibilidade das análises.

Esses resultados demonstram que a modificação do EI com AgHCF, apesar de apresentar um LOD maior que resultados encontrados na literatura [94, 95, 98] de $1,0 \times 10^{-8}$ e $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, evidenciam uma potencialidade analítica que pode ser explorada na aplicação da determinação analítica do fármaco em amostras reais (excipientes e fluidos biológicos), uma vez que as concentrações usualmente encontradas nessas amostras encontram-se dentro da faixa de concentrações de trabalho deste eletrodo.

4.7.2 Efeito de espécies concomitantes na resposta amperométrica do detector e aplicação do método proposto

Visando a aplicação do dispositivo proposto na determinação de INZ em amostras reais foram realizados estudos para verificar o efeito da presença de possíveis interferentes na resposta amperométrica do detector. As espécies escolhidas foram: dopamina (DA), ácido ascórbico (AA), glicose e rifampicina (RIF). As três primeiras espécies foram escolhidas, pois, são eletroativas e eventualmente encontradas como componentes da urina humana, e a rifampicina é um fármaco empregado em associação com a INZ em diversas formulações farmacêuticas. Estudos na presença de ácido úrico não foram realizados devido à baixa solubilidade no pH utilizado para a determinação de INZ (pH 3,0), assim, acredita-se que na preparação da amostra essa espécie seria precipitada e não estaria concomitante ao analito.

Para a realização do estudo de interferentes foram feitas injeções em triplicatas do eletrólito contendo $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de INZ, os sinais transientes obtidos serviram de referência para avaliar o efeito dos interferentes. Na sequência, injeções em triplicata de soluções contendo INZ ($1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) na presença dos interferentes com concentrações de $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ foram realizadas. As Figuras 46A, 46B, 46C e 46D mostram os resultados obtidos.



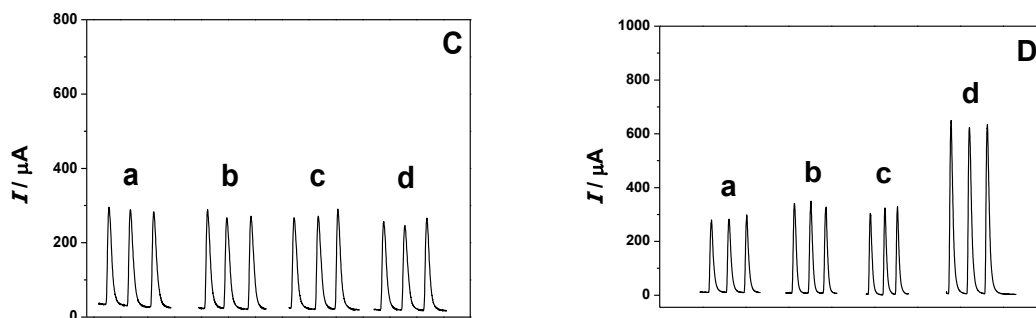


Figura 46 - Sinais transientes obtidos nos estudos de interferentes para as espécies: A – Dopamina (DA); B- Ácido Ascórbico; C – Glicose e D – Rifampicina. Foram injetadas soluções contendo $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de INZ e os interferentes em diferentes concentrações: a – ausência do interferente, b – $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, c – $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e d – $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹

Analisando os resultados obtidos fica evidente uma interferência positiva no sinal na presença de Dopamina (DA), Ácido Ascórbico (AA) e Rifampicina (RIF) para concentrações dez vezes maiores que a da INZ. Isso significa que para amostras contendo um grande excesso dessas espécies seria necessário um procedimento de extração do analito para minimizar o efeito de interferência. No entanto, para concentrações iguais ou dez vezes menores que a concentração de INZ não há interferência significativa, viabilizando essas análises. Estudos realizados com glicose não apresentaram nenhuma interferência significativa nessas condições. Os dados obtidos a partir dos sinais transientes de corrente podem ser sumarizados na Tabela 5.

TABELA 5 - PORCENTAGEM DE INTERFERÊNCIA NO VALOR DO TRANSIENTE REGISTRADA PARA OS CONCOMITANTES AVALIADOS

| Espécie | Concentração | % do sinal obtido |
|-----------------|--|-------------------|
| Dopamina | Ausência* | 100 ± 1,6 |
| | 1,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ | 94 ± 1,3 |
| | 1,0 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ | 115 ± 0,5 |
| | 1,0 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ | 233 ± 1,9 |
| Ácido Ascórbico | Ausência* | 100 ± 1,4 |
| | 1,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ | 94 ± 5,0 |
| | 1,0 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ | 96 ± 10,7 |
| | 1,0 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ | 506 ± 0,7 |
| Glicose | Ausência* | 100 ± 2,6 |
| | 1,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ | 95 ± 4,3 |
| | 1,0 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ | 96 ± 4,3 |
| | 1,0 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ | 92 ± 3,6 |
| Rifampicina | Ausência* | 100 ± 3,7 |
| | 1,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ | 117 ± 3,1 |
| | 1,0 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ | 110 ± 4,3 |
| | 1,0 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ | 220 ± 2,1 |

*Soluções contendo apenas 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de INZ

Os resultados observados para análises dos interferentes DA e AA mostram que há a possibilidade da determinação direta de INZ na presença desses interferentes para amostras onde essas substâncias estejam em concentrações iguais ou menores que a concentração do analito. No caso da glicose, até mesmo em concentrações superiores há a possibilidade de realização da determinação direta de INZ, pelo fato deste analito não se apresentar como interferente nessa proporção. Embora, para as concentrações mais elevadas desse interferente tenha sido observada uma recuperação menor (92%), testes estatísticos usando os valores de média e desvio padrão não mostraram diferença significativa quando comparados as injeções de INZ.

A RIF é frequentemente empregada em associação com a INZ no tratamento de tuberculose. As formulações que contém INZ junto com RIF em sua composição, em geral, apresentam uma quantidade menor de RIF que o conteúdo de INZ, o que em princípio não provocaria grandes complicações para a determinação do fármaco em formulações comerciais.

Após investigar o efeito de interferentes, foi realizada a determinação de INZ pelo procedimento proposto em uma amostra de urina sintética enriquecida com o analito. As análises têm como finalidade verificar a possibilidade de determinação de INZ em componentes da urina, uma vez que 37,5 % de INZ são liberados por via renal na forma não metabolizada.

Para a determinação foram realizadas injeções de diferentes concentrações de INZ variando de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida, foram realizadas três injeções de soluções devidamente preparadas da amostra de urina sintética contendo $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de INZ. Após a injeção da amostra, soluções conhecidas de INZ foram novamente injetadas para verificar possíveis efeitos de envenenamento. Os sinais transientes obtidos estão apresentados na Figura 47.

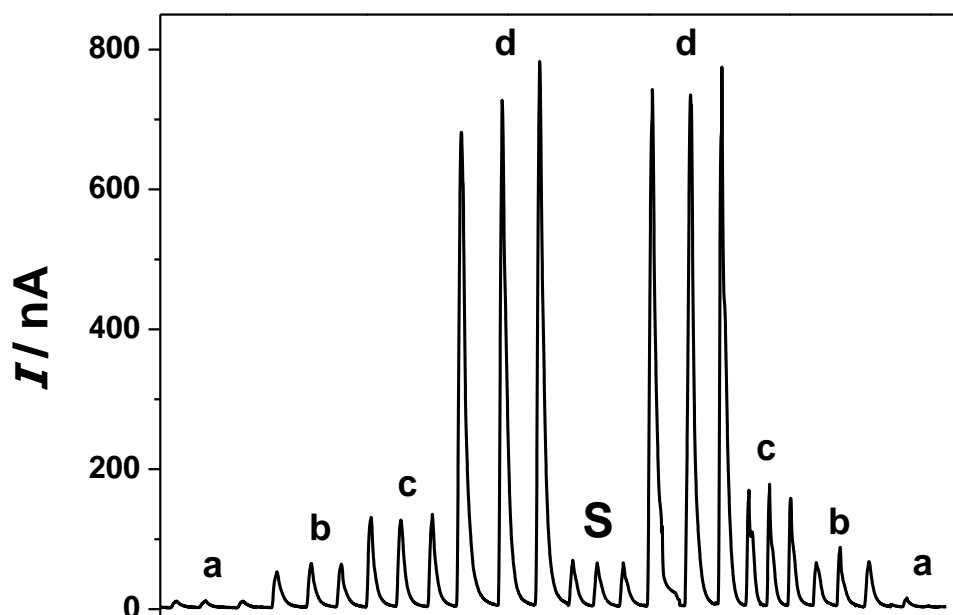


Figura 47 - Sinais transientes obtidos na determinação de INZ. Injeções contendo concentrações conhecidas de INZ de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (a), $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (b), $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (c) $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e (d) $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Amostra de urina sintética enriquecida (S).

Foram observados sinais transientes repetitivos para as diferentes concentrações de INZ, apresentando pequena variação do sinal de uma mesma concentração. Comparando os sinais obtidos para injeções da amostra contendo uma concentração de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de INZ é possível verificar um resultado satisfatório, pois, esses sinais apresentam uma diferença muito pequena quando comparados às correntes obtidas para injeções de solução padrão na mesma concentração, mostradas pelas injeções apresentadas em b. Realizando os cálculos necessários foi observada uma recuperação de INZ na urina de 105,9 %, um resultado muito similar aos resultados encontrados na literatura que fica entorno de 93,3 a 104,0% [94, 96, 97, 99]. Assim, a análise para determinação de INZ em uma amostra de urina sintética é viável, comprovando que os componentes da urina sintetizada não interferem significativamente na determinação quantitativa de INZ.

5. CONCLUSÕES

As nanopartículas de prata (NPAg), quimicamente sintetizadas pelo método bifásico, apresentaram dimensões entre 2 e 5 nm, com uma dispersão pequena em relação ao tamanho. Os eletrodos preparados com a suspensão das NPAg apresentaram uma resposta eletroquímica em meio básico semelhante ao perfil observado pelo eletrodo de prata *Bulk*. Nessas condições, as NPAg apresentaram potencialidade para a oxidação eletrocatalítica de glicerol.

A avaliação potenciométrica dos eletrodos modificados com NPAg evidenciou que o passivante (dodecanotiol) não afeta a resposta esperada para o dispositivo, sendo observado um perfil muito semelhante ao eletrodo de prata *Bulk*, demonstrando sua potencialidade para atuar como um sensor potenciométrico metálico.

A preparação de hexacianoferrato de prata (AgHCF) sobre a superfície dos eletrodos modificados foi muito dependente do procedimento de deposição. O método galvanostático se mostrou uma forma robusta e adequada para a modificação de diferentes substratos, como eletrodos de carbono vítreo (ECV), eletrodos de vidro modificados com óxido de estanho dopado com índio (ITO) e eletrodos de carbono impressos (EI). A preparação de eletrodos impressos modificados (EI-AgHCF) empregando uma corrente anódica de 2,5 μA , por um tempo de 60 s, em solução contendo ferricianeto de potássio em pH 3,0, indicaram uma boa repetibilidade e reprodutibilidade do procedimento.

Do ponto de vista morfológico, não foi observada uma diferença significativa entre os eletrodos impressos não modificados e modificados. Através de imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV), pode ser observada uma alta rugosidade superficial dos eletrodos impressos para ambos os casos. Medidas de espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EDX) mostraram uma diferença significativa na composição química da

superfície eletródica entre esses eletrodos. Adicionalmente, sobre ITO, a presença do AgHCF foi também observada por medidas de espectroscopia Raman.

Os eletrodos modificados EI-AgHCF apresentaram potencialidade como sensor para a determinação de isoniazida (INZ). A proposta de funcionamento é fundamentada na oxidação química do analito pelo modificador, o que permite a determinação de INZ. O dispositivo foi avaliado como detector amperométrico em sistema FIA, apresentando boa sensibilidade e repetibilidade. Depois de otimizados os parâmetros experimentais, foi observado um intervalo de reposta linear para concentrações entre $5,0 \times 10^{-6}$ e $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de INZ e um limite de detecção de $2,6 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

Não foi observada interferência significativa no sinal obtido para a INZ na presença de outras substâncias com potencialidade interferente, em concentrações iguais a do analito. O método proposto foi aplicado na determinação amperométrica de INZ em urina sintética enriquecida com o analito. A amostra não necessitou de nenhum pré-tratamento e resultados de recuperação de 105,9 % foram obtidos.

Através do trabalho realizado foi possível verificar a potencialidade do EI-AgHCF, como sensor amperométrico, para a determinação da INZ, empregando o sistema FIA, tanto para o controle de qualidade deste fármaco quanto para sua análise em fluidos biológicos. Esse dispositivo apresenta ainda características vantajosas em relação à outras técnicas, entre elas a cromatografia, como seu baixo custo e sua praticidade de operação.

6. REFERÊNCIAS

- [1] BERTOTTI, M.; LOWINSOHN, D. **Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos**. Quim. Nova, v. 29, n. 6, p. 1318-1325, 2006.
- [2] ARSHAK, A.; ARSHAK, K.; GILL, E.; KOROSTYNSKA, O. **Response mechanism of novel polyaniline composite conductimetric pH sensors and the effects of polymer binder, surfactant and film thickness on sensor sensitivity**. European Polymer Journal, v. 46, p. 2042–2050, 2010.
- [3] KORPAN, Y. I.; SOLDATKIN, O. O.; SOSOVSKA, O. F.; KLEPACH, H. M.; CSÖREGI, E.; VOCANSON, F.; JAFFREZIC-RENAULT, N.; GONCHAR, M. V. **Formaldehyde-sensitive conductometric sensors based on commercial and recombinant formaldehyde dehydrogenase**. Microchim. Acta, v. 170, p. 337–344, 2010.
- [4] IONESCUA, R. E.; GONDRAN, C.; BOUFFIER, L.; JAFFREZIC-RENAULT, N.; MARTELET, C.; COSNIER, S. **Label-free impedimetric immunosensor for sensitive detection of atrazine**. Electrochim. Acta, v. 55, p. 6228–6232, 2010.
- [5] RIZZATTI, V. M.; ZANETTE, D. R. **Determinação potenciométrica da concentração micelar crítica de surfactantes: uma nova aplicação metodológica no ensino de Química**. Quim. Nova, v. 32, n.2, p. 518-521, 2009.
- [6] TEIXEIRA, M. F. S.; FATIBELLO-FILHO, O.; RAMOS, L. A. **Utilização de um eletrodo de grafite-epóxi recoberto com $[\text{Zn}(\text{Fen})_3][\text{Tetratris}(4\text{-Clorofenil})\text{ Borato}]_2$ sensível a zinco (II) em meio 1,10-Fenantrolina como eletrodo indicador em titulações potenciométricas de precipitação**. Quim. Nova, v. 28, n.5, p. 817-821, 2005.
- [7] SOUSA, A. R.; TRANCOSO, M. A. **Uncertainty of measurement for the determination of fluoride in water and wastewater by direct selective electrode potentiometry**. Accred. Qual. Assur., v. 10, p. 430-438, 2005.
- [8] MARCOLINO-JR, L. H.; BERGAMINI, M. F.; TEIXEIRA, M. F. S.; CAVALHEIRO, E. T. G.; FATIBELLO-FILHO, O. **Flow injection amperometric determination of dipyrone in pharmaceutical formulations using a carbon paste electrode**. Il Farmaco, v. 58, p. 999-1004, 2003.
- [9] BERGAMINI, M. F.; ZANONI, M. V. B. **Anodic Stripping Voltammetric Determination of Aurothiomalate in Urine Using a Screen-Printed Carbon Electrode**. Electroanalysis, v. 18, p. 1457-1462, 2006.

- [10] BERGAMINI, M. F.; SOUZA, L. P.; CALEGARI, F.; ZARBIN, A. J. G.; MARCOLINO-JÚNIOR, L. H. **Voltammetric Determination of the Antioxidant Capacity in Wine Samples Using a Carbon Nanotube Modified Electrode.** J. Agr. Food. Chem., v. 59, p. 7620-7625, 2011.
- [11] HO, K.; CHIANG, W.; CHEN, P.; NIEN, P. **Amperometric detection of cholesterol using an indirect electrochemical oxidation method.** Steroids. v. 76, p. 1535-1540, 2011.
- [12] WANG, J. **Decentralized electrochemical monitoring of trace metals: from disposable strips to remote electrodes.** Analyst, v. 119, n. 5, p. 763-766, 1994.
- [13] HART, J. P.; WRING, S. A. **Screen-printed voltammetric and amperometric electrochemical sensors decentralized testing.** Electroanalysis, v. 6, n. 8, p. 617-624, 1994.
- [14] HART, J. P.; WRING, S. A. **Recent developments in the design and application of screen-printed electrochemical sensors for biomedical, environmental and industrial analyses.** Trends Anal. Chem., v. 16, n. 2, p. 89-103, 1997.
- [15] KADARA, R. O.; JENKINSON, N.; LI, B.; CHURCH, K. H.; BANKS, C. E. **Manufacturing electrochemical platforms: Direct-write dispensing versus screen printing.** Electrochem. Commun., v. 10, p. 1517-1519, 2008.
- [16] TANGKUARAM, T.; PONCHIO, C.; KANGKASOMBOOM, T.; KATIKAWONG, P.; VEERASAI, W. **Design and development of a highly stable hydrogen peroxide biosensor on screen printed carbon electrode based on horseradish peroxidase bound with gold nanoparticles in the matrix of chitosan.** Biosens. Bioelec., v. 22, p. 2071-2078, 2007.
- [17] KOSTAKI, V. T.; FLOROU, A. B.; PRODRUMIDIS, M. I. **Electrochemically induced chemical sensor properties in graphite screen-printed electrodes: The case of a chemical sensor for uranium.** Electrochim. Acta, v. 56, p. 8857-8860, 2011.
- [18] HONEYCHURCH, K. C.; HART, J. P. **Screen-printed electrochemical sensors for monitoring metal pollutants.** Trends Anal. Chem., v. 22, n. 7, p. 456-469, 2003.
- [19] PARAT, C.; BETELU, S.; AUTHIER, L.; POTIN-GAUTIER, M. **Determination of labile trace metals with screen-printed electrode modified by a crown-ether based membrane.** Anal. Chim. Acta, v. 573, p. 14-19, 2006.

- [20] CREW, A.; COWELL, D. C.; HART, J. P. **Development of an anodic stripping voltammetric assay, using a disposable mercury-free screen-printed carbon electrode, for the determination of zinc in human sweat.** *Talanta*, v. 75, n. 5, p. 1221-1226, 2008.
- [21] SATO, N.; OKUMA, H. **Development of single-wall carbon nanotubes modified screen-printed electrode using a ferrocene-modified cationic surfactant for amperometric glucose biosensor applications.** *Sens. Actuators B*, v. 129, p. 188–194, 2008.
- [22] HONEYCHURCH, K. C.; HART, J. P.; KIRSCH, N. **Voltammetric, chromatographic and mass spectral elucidation of the redox reactions of 1-hydroxypyrene occurring at a screen-printed carbon electrode.** *Electrochim. Acta*, v. 49, n. 7, p. 1141–1149, 2004.
- [23] MASAWAT, P.; LIAWRUANGRATH, S.; SLATER, J. M. **Flow injection measurement of lead using mercury-free disposable gold-sputtered screen-printed carbon electrodes (SPCE).** *Sens. Actuators B*, v. 91, n.1-3, p. 52–59, 2003.
- [24] TSAI, D.; KUMAR, A. S.; ZEN, J. **A highly stable and sensitive chemically modified screen-printed electrode for sulfide analysis,** *Anal. Chim. Acta*, v. 556, n. 1, p. 145–150, 2006.
- [25] LASCHI, S.; PALCHETTI, I.; MASCINI, M. **Gold-based screen-printed sensor for detection of trace lead.** *Sens. Actuators B*, v. 114, n. 1, p. 460–465, 2006.
- [26] DAWSON, M. D.; WU, M.; GONG, Z.; MASSOUBRE, D.; ZHANG, Y.; RICHARDSON, E.; GU, E. **Inkjet-printed silver nanoparticle electrodes on GaN-based micro-structured light-emitting diodes.** *Appl. Phys. A*, v. 104, p. 1003-1009, 2011.
- [27] LEMAY, S. G., RASSAEI, L., SINGH, P. S., **Lithography-Based Nanoelectrochemistry,** *Anal. Chem.*, v. 83, p. 3974-3980, 2011.
- [28] NASCIMENTO, V. B.; ANGNES, L. **Eletrodos fabricados por “silk-screen”,** *Quim. Nova*, v. 21, p. 614-629, 1998
- [29] ALEGRET, S.; ALBAREDA-SIRVENT, M.; MERKOÇI, A. **Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review.** *Sens. Actuators B*, v. 69, p. 153-163, 2000.
- [30] BATCHELOR-MCAULEY, C.; WILDGOOSE, G. G.; COMPTON, R. G.; SHAO, L. D.; GREEN, M. L. H. **Copper oxide nanoparticle impurities are responsible for the electroanalytical detection of glucose seen using.** *Sens. Actuators B*, v. 132, p. 356-360, 2008.

- [31] SÁNCHEZ, A., MORANTE, Z. S., PÉREZ, Q. D., SIERRA, I., HIERRO, I. **Development of screen-printed carbon electrodes modified with functionalized mesoporous silica nanoparticles: Application to voltammetric stripping determination of Pb(II) in non-pretreated natural waters.** *Electrochim. Acta*, v. 55, p. 6983–6990, 2010.
- [32] COMPTON, R. G., WILDGOOSE, G. G., REES, N. V., STREETER, I., BARON, R. **Design, fabrication, characterization and application of nanoelectrode arrays.** *Chem. Phys. Lett.*, v. 459, n. 1, 2008.
- [33] PING, J.; WANG, Y.; FAN, K.; WU, J.; YING, Y. **Direct electrochemical reduction of graphene oxide on ionic liquid doped screen-printed electrode and its electrochemical biosensing application.** *Biosens. Bioelectron.*, v. 28, p. 204–209, 2011.
- [34] GIL, E. P.; BERNALTE, E.; SÁNCHEZ, C. M. **Determination of Mercury in ambiente water samples by anodic stripping voltammetry on screen-printed gold electrodes.** *Anal. Chim. Acta*, v. 689, p. 60-64, 2011.
- [35] MORENO, M.; ARRIBAS, A. S.; BERMEJO, E.; CHICARRO, M.; ZAPARDIEL, A.; RODRÍGUEZ, M. C.; JALIT, Y.; RIVAS, G. A. **Selective detection of dopamine in the presence of ascorbic acid using carbon nanotube modified screen-printed electrodes.** *Talanta*, v. 80, p. 2149-2156, 2010.
- [36] HART, J. P.; BOUJTITA, M.; PITTSO, R. **Development of a disposable ethanol biosensor based on a chemically modified screen-printed electrode coated with alcohol oxidase for the analysis of beer.** *Biosens. Bioelectron.*, v. 15, p. 257-263, 2000.
- [37] BATCHELOR-MCAULEY, C.; WILDGOOSE, G. G. **The influence of substrate effects when investigating new nanoparticle modified electrodes exemplified by the electroanalytical determination of aspirin on NiO nanoparticles supported on graphite.** *Electrochem. Comm.*, v. 10, p. 1129, 2008.
- [38] MASHHADIZADEH, M.H.; ESKANDARI, K.; FOROUMADI, A.; SHAFIEE, A. **Copper(II) modified carbon paste electrodes based on self-assembled mercapto compounds-gold-nanoparticle.** *Talanta*, v. 76, p. 1497, 2008.
- [39] WANG, S. F.; XU, Q.; LIU, G. D. **Differential pulse voltammetric determination of uric acid on carbon-coated iron nanoparticle modified glassy carbon electrodes.** *Electroanalysis*, v. 20, p. 1116-1120, 2008.

- [40] KUBOTA, L. T.; PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S. **Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas**. *Quim. Nova*, v. 25, p. 1012-1021, 2002.
- [41] SOUZA, M. F. B. **Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem**. *Quim. Nova*, v. 20, n. 2, p. 191-195, 1997.
- [42] TELEFONCU, A.; ALPAT, S. K.; ALPAT, S. **A sensitive determination of dopamine in the presence of ascorbic acid using a nafion-coated clinoptilolite-modified carbon paste electrode**. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 383, p. 695-700, 2005.
- [43] MECHIAKH, R.; BEN SEDRINE N.; BEN NACEUR, J.; CHTOUROU, R. **Elaboration and characterization of nanocrystalline TiO₂ thin films prepared by sol-gel dip-coating**. *Surf. Coating. Tech.*, v. 206, p. 243-249, 2011.
- [44] YANG, N.; ZHUANG, H.; HOFFMANN, R.; SMIRNOV, W.; HEES, J.; JIANG, X.; NEBEL, C. E. **Nanocrystalline 3C-SiC Electrode for Biosensing Applications**. *Anal. Chem.*, v. 83, p. 5827-5830, 2011.
- [45] YOON, S.; MOFRAD, M. R. K. **Cell adhesion and detachment on gold surfaces modified with a thiol-functionalized RGD peptide**. *Biomaterials*, v. 32, p. 7286-7296, 2011.
- [46] SI, P.; KANNAN, P.; GUO, L.; SON, H.; KIM, D. **Highly stable and sensitive glucose biosensor based on covalently assembled high density Au nanostructures**. *Biosens. Bioelectron.*, v. 26, p. 3845-3851, 2011.
- [47] BONIFÁCIO, V. G.; MARCOLINO JR., L. H.; TEIXEIRA, M. F. S.; FATIBELLO-FILHO, O. **Voltammetric determination of isoprenaline in pharmaceutical preparations using a copper (II) hexacyanoferrate (III) modified carbon paste electrode**. *Microchem. J.*, v. 78, p. 55-59, 2004.
- [48] SHAHROKHIANA, S.; ASADIAN, E. **Simultaneous voltammetric determination of ascorbic acid, acetaminophen and isoniazid using thionine immobilized multi-walled carbon nanotube modified carbon paste electrode**. *Electrochim. Acta*, v. 55, p. 666-672, 2010.
- [49] ROSHANDEL, R.; TAVAKOLI, B. **The effect of fuel cell operational conditions on the water content distribution in the polymer electrolyte membrane**. *Renew. Energ.*, v. 36, p. 3319-3331, 2011.
- [50] PÉRES, L. O.; LI, R. W.C.; YAMAUCHI, E. W.; LIPPI, R.; GRUBER, J. **Conductive polymer gas sensor for quantitative detection of methanol in Brazilian sugar-cane spirit**. *Food Chem.*, v. 130, p. 1105-1107, 2012.

- [51] ZARBIN, A. J. G. **(Nano) materials chemistry**. Quim. Nova, v. 30, p. 1469-1479, 2007.
- [52] SANTTARAHMADY, N.; HELI, H. **An electrocatalytic transducer for L-cysteine detection based on cobalto hexacyanoferrate nanoparticles with a core-shell structure**. Anal. Biochem., v. 409, p. 74-80, 2011.
- [53] WANG, Y.; HERRON, N. **Chemical effects on the optical properties of semiconductor particles**. J. Phys. Chem., v. 91, p. 5005-5008, 1987.
- [54] ALIVISATOS, A. P.; HARRIS, A. L.; LEVINOS, N. J.; STEIGERWALD, M. L.; BRUS, L. E. **Electronic states of semiconductor clusters: homogeneous and inhomogeneous broadening of the optical spectrum**. J. Chem. Phys., v. 89, p. 4001, 1988.
- [55] BRUS, L. **Electronic wave functions in semiconductor clusters: experiment and theory**. J. Phys. Chem., v. 90, p. 2555-2560, 1986.
- [56] BRUST, M.; KIELY, C. J. **Some recent advances in nanostructure preparation from gold and silver particles: a short topical review**. Colloid. Surface Physicochem. Eng. Aspect, v. 202, p. 175-186, 2002.
- [57] SHAHROKHIAN, S.; GHALKHANI, M.; GHORBANI, B. F. **Voltammetric studies of sumatriptan on the surface of pyrolytic graphiteelectro de modified with multi-walled carbon nanotubes decorated with silver nanoparticles**. Talanta, v. 80, p. 31-38, 2009.
- [58] CHIALVO, A. C.; MONTERO, M. A.; GENNERO DE CHIALVO, M. R. **Electrocatalytic activity of core-shell Au@Pt nanoparticles for the hydrogen oxidation reaction**. Int. J. Hydrogen Energ., v. 36, p. 3811-3816, 2011.
- [59] WELCH, C.; COMPTON, R. G. **The use of nanoparticles in electroanalysis: a review**. Anal. Bioanal. Chem., v. 384, p. 601-619, 2006.
- [60] BAHADORY, M. **Synthesis of Noble Metal Nanoparticles**, A Thesis of Doctor of Philosophy, Faculty of Drexel University, 2008.
- [61] PRADEEP T.; ANSHUP. **Noble metal nanoparticles for water purification: A critical review**. Thin Solid Films, v. 517, p. 6441-6478, 2009.
- [62] ZHOU, Y.; CAMPBELL, F. W.; BELDING, S. R.; COMPTON, R. G. **Nanoparticle modified electrodes: Surface coverage effects in voltammetry showing the transition from convergent to linear diffusion. The reduction of aqueous chromium (III) at silver nanoparticle modified electrodes**. Chem. Phys. Lett., v. 497, p. 200-204, 2010.

- [63] COMPTON, R. G.; DAÍ, X.; WILDGOOSE, G. G.; SALTER, C.; CROSSLEY, A. **Electroanalysis Using Macro-, Micro-, and Nanochemical Architectures on Electrode Surfaces. Bulk Surface Modification of Glassy Carbon Microspheres with Gold Nanoparticles and Their Electrical Wiring Using Carbon Nanotubes.** *Anal. Chem.*, v. 78, p. 6102-6108, 2006.
- [64] YOU, T.; LIU, Y.; WANG, D.; XUA, L.; HOU, H. **A novel and simple route to prepare a Pt nanoparticle-loaded carbon nanofiber electrode for hydrogen peroxide sensing.** *Biosens. Bioelectron.*, v. 26, p. 4585– 4590, 2011.
- [65] MARTÍNEZ, M. J. A.; RENEDO, O. D.; RUIZ-ESPELT, L.; GARCÍA-ASTORGANO, N. **Electrochemical determination of chromium(VI) using metallic nanoparticle-modified carbon screen-printed electrodes.** *Talanta*, v. 76, p. 854-858, 2008.
- [66] OMIDFAR, K.; LARIJANI, B.; DEHDAST, A.; SOURKOHI, B. K. **Development of urinary albumin immunosensor based on colloidal AuNP and PVA.** *Biosens. Bioelectron.*, v. 26, p. 4127-4183, 2011.
- [67] SHEN, G.; YU, R.; YANG, M.; YANG, Y.; LIU, Y. **Platinum nanoparticles-doped sol-gel/carbon nanotubes composite electrochemical sensors and biosensors.** *Biosens. Bioelectron.*, v. 21, p. 1125-1131, 2006.
- [68] TAMIYA, E.; CHIKAE, M.; IDEGAMI, K.; KERMAN, K.; NAGATANI, N.; ISHIKAWA, M.; TAKAMURA, Y. **Direct fabrication of catalytic metal nanoparticles onto the surface of a screen-printed carbon electrode.** *Electrochem. Comm.*, v. 8, p. 1375-1380, 2006.
- [69] LI, Y.; YANG, Q.; ZHAN, N.; SUN, L.; WANG, H.; SONG, Y.; ZHANG, C. **Silver nanoparticles grown on the surface of PAN nanofiber: Preparation, characterization and catalytic performance.** *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, v. 362, p. 58–64, 2010.
- [70] MARTÍNEZ, M. J. A.; RENEDO, O. D. **A novel method for the anodic stripping voltammetry determination of Sb(III) using silver nanoparticle-modified screen-printed electrodes.** *Electrochem. Comm.*, v. 9, p. 820-826, 2007.
- [71] SUN, X.; QUIN, X.; LU, W.; LUO, Y.; CHANG, G. **Preparation of Ag nanoparticle-decorate polypyrrole colloids and their application for H₂O₂ detection.** *Electrochem. Comm.*, v. 13, p. 785-787, 2011.
- [72] WELCH, C. M.; BANKS, C. E.; SIMM, A. O.; COMPTON, R. G. **Silver nanoparticle assemblies supported on glassy-carbon electrodes for the**

electro-analytical detection of hydrogen peroxide. Anal. Bioanal. Chem, v. 382, p. 12–21, 2005.

[73] ZAMPONI, S.; BERRETTONI, M.; KULESZA, P. J.; MIECZNIKOWSKI, K.; MALIK, M. A.; MAKOWSKI, O.; MARASSI, R. **Influence of experimental conditions on electrochemical behavior of Prussian blue type nickel hexacyanoferrate film.** Electrochim. Acta, v. 48, p. 4261-4269, 2003.

[74] KARYAKIN, A. A. **Prussian Blue and Its Analogues: Electrochemistry and Analytical Applications.** Electroanalysis, v. 13, n. 10, p. 813-819, 2001.

[75] ZAMPONI, S.; MALIK, M. A.; KULESZA, P. J.; MARASSI, R.; NOBILI, F.; MIECZNIKOWSKI, K. **Counteraction intercalation and kinetics of charge transport during redox reactions of nickel hexacyanoferrate.** Electrochim. Acta, v. 49, p. 4253–4258, 2004.

[76] SCHOLZ, F.; SCHRÖDER, U. **The Solid-State Electrochemistry of Metal Octacyanomolybdates, Octacyanotungstates, and Hexacyanoferrates Explained on the Basis of Dissolution and Reprecipitation Reactions, Lattice Structures, and Crystallinities.** Inorg. Chem., v. 39, p. 1006-1015, 2000.

[77] TACCONI, N. R.; RAJESHWAR, K. **Metal Hexacyanoferrates: Electrosynthesis, in Situ Characterization, and Applications.** Chem. Mater, v. 15, p. 3046-3062, 2003.

[78] HILLMAN, A. R.; SKAPEK, M. A.; GURMAN, S. J. **EXAFS structural studies of electrodeposited Co and Ni hexacyanoferrate films.** J. Solid. State Electrochem., v. 14, p. 1997–2010, 2010.

[79] BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. **Eletroquímica: Princípios Métodos e Aplicações,** Nova Iorque, Oxford University Press Inc., p. 310, 1996.

[80] NOROOZIFAR, M.; KHORASANI-MOTLAGH, M.; TAHERI, A. **Preparation of silver hexacyanoferrate nanoparticles and its application for the simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid.** Talanta, v. 80, p. 1657–1664, 2010.

[81] SHEN, G.; YANG, M.; YANG, Y.; QU, F.; LU, Y.; YU, R. **Attachment of nickel hexacyanoferrates nanoparticles on carbon nanotubes: Preparation, characterization and bioapplication.** Anal. Chim. Acta, v. 571, p. 211-217, 2006.

[82] ZHENG, J.; MENG, Z.; SHENG, Q.; ZHENG, X. **In situ synthesis of thulium(III) hexacyanoferrate(II) nanoparticle and its application for glucose detection.** Anal. Chim. Acta, v. 689, p. 47-51, 2011.

- [83] FENGA, P. G.; STRADIOTTO, N. G.; PIVIDORI, M. I. **Silver Nanocomposite Electrode Modified with Hexacyanoferrate Preparation, Characterization and Electrochemical Behaviour Towards Substituted Anilines**. *Electroanalysis*, v. 23, p. 1100 – 1106, 2011.
- [84] ZAGATTO, E. A. G.; OLIVEIRA, C. C.; COLLINS, C. H. **Classificação e definição dos métodos de análises em fluxo (Recomendações – IUPAC 1994)**. *Quím. Nova*, v. 22, n. 1, p. 143-146, 1996.
- [85] RUZICKA, J. **The second coming of flow-injection analysis**. *Analytica Chimica Acta*, v. 261, p. 3-10, 1992.
- [86] MASINI, J. C.; SANTOS, A. C. V. **A análise por injeção sequencial (SIA): vinte anos em uma perspectiva brasileira**. *Quim. Nova*, v. 33, n. 9, p. 1949-1956, 2010.
- [87] RUDZICKA, J.; HANSEN, E. H. **Flow injection analysis. Principles, applications and trends**. *Anal. Chim. Acta*, v. 114, p. 19-44, 1980.
- [88] COUTO, C. M. C. M.; LIMA, J. L. F. C.; MONTENEGRO, M. C. B. S. M.; REIS, B. F.; ZAGATTO, E. A. G. **Potentiometric flow injection determination of cadmium in waste waters including in-line ion-exchange separation/concentration**. *Anal. Chim. Acta*, v. 366, p. 155-161, 1998.
- [89] PAIXÃO, T. R. L. C.; MARUTA, A. H. **Flow injection analysis of free glycerol in biodiesel using a copper electrode as an amperometric detector**. *Fuel* 91, p. 187–191, 2012.
- [90] MERCK: **The Merck Index**. MERCK & CO INC.12 ed. N.J: Whitehouse station. 2000.
- [91] ESPINOSA-MANSILLA, A.; VALENZUELA, M. I. A.; DE LA PEÑA, A. M.; SALINAS, F.; CAÑADA CAÑADA, F. **Determination of antitubercular drugs by micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC)**. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 374, p. 432-436, 2002.
- [92] RAJ, C. R.; JENA, B. K. **Au nanoparticle decorated silicate network for the amperometric sensing of isoniazid**. *Talanta*, v. 80, p. 1653–1656, 2010.
- [93] GUO, L.; YAN, X.; BO, X. **Electrochemical behaviors and determination of isoniazid at ordered mesoporous carbon modified electrode**. *Sens. Actuators B*, v. 155, p. 837–842, 2011.
- [94] BERGAMINI, M. F.; SANTOS, D. P.; ZANONI, M. V. B. **Determination of isoniazid in human urine using screen-printed carbon electrode modified with poly-L-histidine**. *Bioelectrochemistry*, v. 77, p. 133-138, 2010.
- [95] SOHRANI A. S.; AHMAD B.; KHALID, J. H. **Acetylation percentage method for determination of acetylator status in human volunteers and**

tuberculous patients. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 8, p. 11-6, 1995.

[96] ASADPOUR-ZEYNALI, K.; SOHEILI-AZAD, P. Simultaneous polarographic determination of isoniazid and rifampicin by differential pulse polarography method and support vector regression, **Electrochim. Acta**, v. 55, p. 6570–6576, 2010.

[97] SHAHROKHIAN, S.; ASADIAN, E. **Simultaneous voltammetric determination of ascorbic acid, acetaminophen and isoniazid using thionine immobilized multi-walled carbon nanotube modified carbon paste electrode.** Electrochim. Acta, v. 55, p. 666–672, 2010.

[98] YANG, G.; WANG, C.; ZHANG, R.; WANG, C.; QU, Q.; HU, X. **Poly(amidosulfonic acid) modified glassy carbon electrode for determination of isoniazid in pharmaceuticals.** Bioelectrochemistry, v. 73, p. 37–42, 2008.

[99] YAN, X.; BO, X.; GUO, L. **Electrochemical behaviors and determination of isoniazid at ordered mesoporous carbon modified electrode,** Sens. Actuators B, v. 155, p. 837–842, 2011.

[100] OLIVEIRA, M. M.; UGARTE, D.; ZAUCHET, D.; ZARBIN, A. J. G. **Influence of synthetic parameters on the size, structure, and stability of dodecanethiol-stabilized silver nanoparticles.** J. Colloid Interf. Sci., v. 292, p. 429-435, 2005.

[101] PARK, J.; QUAN, H.; PARK, S. **Electrochemical oxidation of glucose on silver nanoparticle-modified composite electrodes.** Electrochim. Acta, v. 55, p. 2232-2237, 2010.

[102] PASA, A. A.; ALAMINI, M. F.; SILVA, R. C.; ZOLDAN, V. C.; ISOPPO, E. A.; RODRIGUES FILHO, U. P.; Reis, F. D. A. A.; KLEIN, A. N. **Normal versus anomalous roughening in electrodeposited Prussian Blue layers.** Electrochem. Comm., v. 13, p. 1455–1458, 2011.

[103] GARCIA-JAREFIO, J. J.; SANMATIAS, A.; NAVARRO-LABOULAIS, J.; BENITO, D.; VICENTE, D. **Temperature dependence of impedance spectra of Prussian Blue films deposited on IT0 electrodes.** Electrochim. Acta, v. 43, p. 235-243, 1998.

[104] SILVA, R. C. **Preparação e aplicação de eletrodos de pasta de carbono modificados com ditiocarbamatos para a análise de fármacos,** Dissertação de mestrado, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo: São Carlos, 2006.

- [105] CULLITY, B. D. **Elements of X-Ray diffraction**, 2 ed. Addison – Wesley Publishing Company, INC., p. 555, 1978.
- [106] JENKINS, R. **JCPDS – International Centre Diffraction Data – Sample Preparation Methods in X – Ray Powder Diffraction**. Powder Diffraction. v. 1, pag 51-63, 1986.
- [107] ROSSEINSKY, D. R.; MORTIMER, R. J. **Iron Hexacyanoferrate Films : Spectroelectrochemical Distinct ion and Electrodeposition Sequence of 'Soluble' (K+-containing) and 'Insoluble' (K+-free) Prussian Blue, and Composition Changes in Polyelectrochromic Switching**. J. Chem. Soc. Dalton Trans., p. 2059-2061, 1984.
- [108] BERNE; PECORA. **"Dynamic Light scattering"** John Wiley, 1975.
- [109] GOUADEC, G.; COLOMBAN, P. **Raman Spectroscopy of nanomaterials: How spectra relate to disorder, particle size and mechanical properties**. Progr. Cryst. Growth. Char. Mater., v. 53, p.1-56, 2007.
- [110] NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman Spectra of inorganic and coordination compounds**. 4. ed. Nova York: John & Willey, 1986.
- [111] DEMOTT JR, J. M.; JAHNGENB, E. G. E. **Determination of Amino Acids at a Silver Oxide/Silver Phosphate Electrode and the Analysis of Structure-Response Relationships**. Electroanalysis, v. 17, n. 7, p. 599-606, 2005.
- [112] MURPHY, J. D.; THAMSIRIROJ, T. **The impact of the life cycle analysis methodology on whether biodiesel produced from residues can meet the EU sustainability criteria for biofuel facilities constructed after 2017**. Renew. Energ., v. 36, p. 50-63, 2011.
- [113] SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, J. F.; CROUCH, S. R. **Fundamentos da Química Analítica**. tradução 8ª edição. São Paulo: Cengage Learning, p 558-559, 2009.
- [114] NARAYANAN, S. S.; JAYASRI, D. **Electrocatalytic oxidation and amperometric determination of BHA at graphite–wax composite electrode with silver hexacyanoferrate as electrocatalyst**. Sens. Actuat. B, v. 119, p. 135-142, 2006.
- [115] NARAYANAN, S. S.; SCHOLZ, F. **A comparative study of the electrocatalytic activities of some metal hexacyanoferrates for the oxidation of hydrazine**. Electroanalysis, v. 11, p. 465 - 469, 1999.

[116] NEFF, V. D.; MOON, S. B.; XIDIS, A. **Kinetics of Electrolysis of Transition-Metal Hexacyanide Films and Reduction of Silver Ferricyanide.** J. Phys. Chem., v. 97, p. 1634-1638, 1993.